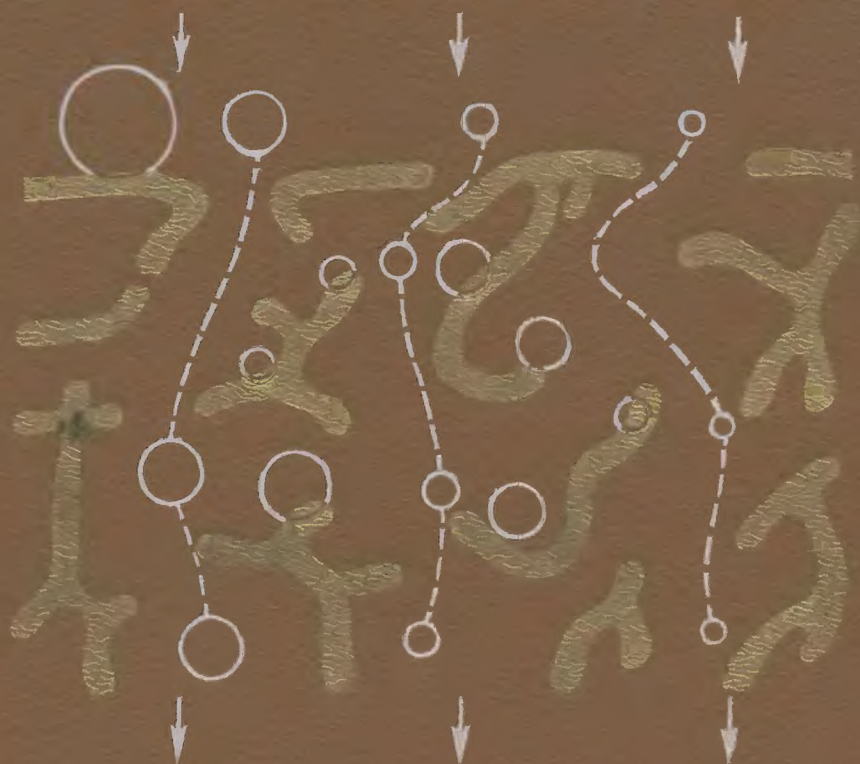


VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Т. Брок

МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ



МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Membrane filtration:

A User's Guide
and Reference Manual

Thomas D. Brock

A Publication of
Science Tech, Inc. Madison, WI

Т.Брок

МЕМБРАННАЯ

ФИЛЬТРАЦИЯ

Перевод с английского
канд. хим. наук С. М. ЗЕНЬКОВСКОГО,
канд. хим. наук М. Л. ШУЛЬМАНА

под редакцией
канд. хим. наук Б. В. МЧЕДЛИШВИЛИ



МОСКВА «МИР» 1987

ББК 24.5
Б88
УДК 541.1

Брок Т.

Б88 Мембранная фильтрация: Пер. с англ.—М.: Мир, 1987.— 464 с., ил.

В книге известного американского специалиста подробно рассматриваются структура и принцип действия мембранных фильтров, вопросы изготовления, их характеристики, применения в процессах ультрафильтрации и обратного осмоса, для подсчета колоний микроорганизмов в медицинских и аналитических целях, в пищевой промышленности, для анализа вирусов, находящихся в воде, и для очистки воздуха. Даются рекомендации по выбору мембранных фильтров, сообщаются сведения о фирмах-изготовителях.

Для широкого круга физиков, химиков и специалистов в области молекулярной биологии и биотехнологии. Книга может быть использована как справочное и учебное пособие.

Б⁷ $\frac{1805000000-158}{041(01)-87}$ 99—87, ч. 1

ББК 24.5

Редакция литературы по физике и астрономии

© 1983 by Thomas D. Brock

© Перевод на русский язык, «Мир», 1987

Предисловие редактора перевода

Книга известного американского специалиста Т. Брока «Мембранная фильтрация» посвящена практическим вопросам новой отрасли техники и технологии, а именно мембранной технологии. В ней дается подробное описание мембранных фильтров, производимых за рубежом, и в очень доступной форме рассматриваются их основные свойства. Весьма большое место отведено обсуждению методик разделения, анализа и очистки газов и жидкостей, основанных на использовании мембранных фильтров. Автор много внимания уделяет вопросам, связанным с обслуживанием мембранной аппаратуры. Особенно подробно он описывает микробиологические и биотехнологические аспекты применения мембран. Все это дает уверенность в том, что материал, приведенный в книге, представит несомненный интерес как для специалистов по мембранным методам, так и для тех, кто только начинает специализироваться в данной области.

К сожалению, в книге недостаточно полно отражены характеристики трековых мембран, изготавливаемых методами ядерной физики. Один из типов этих мембран, а именно ядерные фильтры, не упомянуты вообще. Трековые же мембраны в настоящее время получили общее признание как превосходящие (во многих случаях) по своим свойствам традиционные мембранные фильтры. Этот пробел восполняется в предисловии акад. Г. Н. Флерова, который дает полную картину свойств и важных применений ядерных фильтров.

В большой мере справиться с возникшими при редактировании перевода книги трудностями позволила помощь проф. Ю. И. Дытнерского, Р. Г. Кочарова и Н. С. Орлова (специалистов в области мембранной фильтрации), Г. П. Калины (специалиста по микробиологии окружающей среды), а также В. М. Зайдеса и А. А. Свитцова (специалистов в области применения мембран в молекулярной биологии и биотехнологии). Всем им я приношу искреннюю благодарность.

Перевод выполнен канд. хим. наук С. М. Зеньковским (гл. 1—7) и канд. хим. наук М. Л. Шульманом (гл. 8—14 и приложение).

Б. Мчедlishvili

Предисловие акад. Г. Н. Флерова

Фильтрация как метод очистки различного рода жидкостей используется человеком с давних времен: еще древние египтяне процеживали через ткани вино, сохранились также древние китайские тексты с гравюрами, которые позволяют представить в подробностях многостадийный процесс очистки раствора поваренной соли от примесей путем фильтрации его через ряд циновок особого плотного плетения.

Однако в книге, которая предлагается вниманию читателей, речь пойдет главным образом о фильтрации не в таком классическом понимании, а о мембранной фильтрации, позволяющей осуществить ряд принципиально новых технологических процессов тонкого разделения различных жидкостей и газов. В этих процессах в качестве пористых перегородок используют полимерные пленки (мембраны) с развитой системой пор, размеры которых колеблются от тысячной доли микрона до нескольких микрон.

Фильтры, как правило, представляют собой «содружество» тесно переплетенных тонких волокон или механически соединенных тем или иным образом между собой частиц. Поры в фильтрах — пространство между этими гранулами или волокнами. Диапазон размеров пор фильтров находится обычно в пределах от десяти до нескольких микрометров. Фильтры могут быть изготовлены как из неорганических материалов (например, скрепленные между собой волокна асбеста или стекла, гранулы кварца или мелкие частицы металла), так и из синтетических полимеров (полимерные волокна и гранулы). Делаются фильтры в виде довольно толстых (1—10 мм) листов, а также в виде катушек или патронов. В последнем случае жгуты из волокон плотно наматываются на полый центральный стержень; толщина слоя волокон в таких патронах может достигать 3—5 см.

Мембраны же являются тонкими (не более 0,3 мм) полимерными пленками, имеющими на микроскопическом уровне обычно вид капиллярного, сетчатого или губчатого каркаса, отдельные элементы структуры которого представляют собой неразрывное целое. Порами в мембранах являются просветы между звеньями этого пористого каркаса. Таким образом, в отличие от фильтров мембраны — типичные представители двухфазных коллоидных систем типа «газ — твердое тело».

Не вдаваясь более в терминологические подробности, заметим только, что, на наш взгляд, различие между обычными и мембранными фильтрами скорее диалектическое: при переходе от фильтров к мембранам мы, как правило, переходим к пористым перегородкам со все более малыми порами. Мембранную фильтрацию в отличие от обычной ведут, как правило, в режимах тангенциального (т. е. касательного, а не нормального к поверхности мембраны) потока фильтруемой среды.

В настоящее время процессы мембранной фильтрации используются в огромном числе технологических схем и сфера их применения все более расширяется. Это главным образом связано с технологической простотой, высокой эффективностью, малой материало- и энергоемкостью мембранных процессов. Например, лишь методы мембранной фильтрации позволяют эффективно выделить из огромных объемов жидкостей и газов практически все содержащиеся там болезнетворные микроорганизмы (стерилизующая фильтрация сред). Классическим примером низкой энергоемкости является обессоливание воды с помощью обратного осмоса; затраты в этом случае примерно в 10 раз ниже, чем при опреснении воды дистилляцией. В настоящее время разработаны мембранные аппараты столь компактные, что в очень малом их объеме, равном объему спичечного коробка, можно заключить мембраны с площадью поверхности около одного квадратного метра.

В настоящее время технологии, основанные на мембранных процессах, интенсивно развиваются; поэтому за рубежом мембраны и соответствующее оборудование выпускаются огромным числом фирм. Только в книге Т. Брока упомянуто более 50-ти таких фирм, на самом деле их гораздо больше. Еще огромное номенклатура производимых фирмами мембран. Так, известная фирма «Миллипор корпорейшн» (США) производит более десятка типов микрофильтрационных мембран, каждый из которых в свою очередь может отличаться размерами, величиной пор, видом упаковки, цветом; мембраны могут выпускаться с гладкой или с разграфленной на секторы поверхностью; для особых видов работ отдельные участки мембран могут быть гидрофобизированы. В Советском Союзе мембраны (включая мембраны для газоразделения, микрофильтрации, ультрафильтрации, диализа и обратного осмоса) производят около 10-ти организаций.

Основная масса выпускаемых в настоящее время мембран имеет сетчатую структуру. Традиции изготовления подобных синтетических мембран насчитывают около 100 лет. В первых же опытах по исследованию свойств мембран специалисты в области коллоидной химии использовали природные мембраны (например, плавательный пузырь рыб). Именно к этим опытам

восходят открытия удивительных свойств биологических клеточных мембран. Сейчас, например, стало ясно, что избирательная проницаемость стенок этих мембран для различных ионов определяется существованием в мембранах транспортных пор. Эти ионные каналы, образованные макромолекулами белков, имеют узкий селективный слой вблизи наружной поверхности мембраны. Размер поры вблизи этого селективного слоя составляет около $3 \times 5 \text{ \AA}$; при этом вдоль стенок пор расположены гидрофильные заряженные группы, придающие всей системе дополнительную избирательность.

Поскольку биологические мембраны играют важную роль в живом организме, сделаем здесь небольшое отступление и укажем, хотя бы приблизительно, площадь их общей поверхности. Так, в организме человека, состоящем примерно из $6 \cdot 10^{13}$ клеток, площадь общей поверхности мембран (включая поверхность самих клеток и поверхность мембран многочисленных внутриклеточных образований) составляет не менее десяти миллионов квадратных метров!

Естественно, биологическая мембрана — это своеобразная, чрезвычайно сложно и в высшей степени рационально действующая «машина». Скопировать полностью ее функцию для получения ионселективных мембран пока невозможно. До сих пор это удалось сделать лишь чисто механически: диализные и обратноосмотические мембраны позволяют, как уже упоминалось, селективно удалять из воды растворенные в ней соли. В наше время водой, опресненной с помощью мембран традиционного типа, снабжаются целые города. Последнее, кстати, характеризует и высокую производительность этих мембран, что немало важно там, где необходима фильтрация больших объемов жидкостей или газов. Поэтому традиционные мембраны выпускаются сейчас за рубежом миллионами квадратных метров в год.

Заметим здесь, что кроме высокой производительности и избирательности мембраны должны обладать еще одним немаловажным свойством: во многих случаях абсолютно недопустимо, чтобы сама мембрана выделяла в фильтрат какие-либо частицы или вещества. Традиционные мембраны, полученные методом коллоидной химии, такими свойствами, к сожалению, зачастую не обладают: отдельные участки глобулярного или губчатого скелета, плохо связанные с основным каркасом, под влиянием тех или иных воздействий могут отрываться и свободно мигрировать в фильтрат. Подобные глобулы хорошо заметны на микрофотографиях, приводимых в данной книге. Кроме того, поверхность традиционных мембран в высшей степени разветвлена: в 1 г таких мембран может содержаться более 100 м^2 поровой поверхности (если сложить вместе все элементы губча-

того каркаса сетчатых мембран, то длина получившейся нити будет превышать расстояние от Земли до Луны). Поэтому в фильтрат с такой разветвленной поверхности может попасть и большое количество экстрагируемых веществ.

Существует, однако, способ получения мембран, лишенных подобных существенных недостатков: при этом плотная полимерная пленка используется как заготовка для получения истинной капиллярно-пористой структуры. Такого рода мембраны, производство которых основано на методах ядерной физики, выпускаются в СССР (под названием «ядерные фильтры») и фирмой США «Нуклепор корпорейшн» (мембранные фильтры Нуклепор). Основа технологии получения этих мембран заключается в избирательном травлении треков, образованных в тонких (5—12 мкм) сплошных полимерных пленках ускоренными тяжелыми ионами или осколками деления¹.

Первые трековые мембраны были разработаны сравнительно недавно, а именно в начале 1960-х годов, специалистами фирмы «Дженерал электрик компани». При этом для получения треков были использованы осколки реакции деления, вызванные облучением довольно большим потоком нейтронов (свыше 10^{11} нейтронов в секунду) слоя делящегося вещества (U^{235}). Но опасность радиоактивного загрязнения таких мембран, получаемых столь неэффективным методом, имплантируемыми осколками деления в ряде случаев затрудняет или делает полностью невозможным использование этих мембран. Кроме того, у таких мембран существует довольно большой разброс пор, определяемый различиями в энергии и массе осколков деления, которыми облучается исходная полимерная пленка.

Следующим шагом в технике получения мембран стало использование пучков однородных ускоренных тяжелых ионов. Начиная с 1974 г., этот метод с успехом применяется для получения нового типа пористых перегородок, называемых ядерными фильтрами. Каковы же отличительные особенности ядерных фильтров? Прежде всего, это рекордно малый разброс размеров пор (до $\pm 2\%$ среднего размера пор). Ядерные фильтры могут быть получены практически из любого пленочного материала (как из полимеров, так и из тонких слоев кристаллов). Интервал размеров пор ядерных фильтров — от сотых долей микрометра (мембраны) до сотен микрометров (фильтры, сита). В настоящее время разработана технология получения металлических ядерных фильтров. Этим самым существенно увеличивается ди-

¹ Технология получения трековых мембран подробно описывается в работе: Флеров Г. Н. Синтез сверхтяжелых элементов и применение методов ядерной физики в смежных областях.—Вестник АН СССР, 1984, № 4, с. 35—48.

апазон температур, при которых могут работать мембраны. У ядерных фильтров практически полностью отсутствуют выделение экстрагируемых веществ и миграция в фильтрат кусочков материала мембран, о чем шла речь выше. Неограниченны возможности ядерных фильтров и как основы для получения химически модифицированных мембран с направленно регулируемой физико-химией поверхности. Форма пор ядерных фильтров может быть самой разнообразной (конусные поры, поры бутылкообразные и бочкообразные, поры в виде песочных часов и т. д.). Особый интерес представляют ядерные фильтры повышенной производительности с тонкими селективными слоями.

В предлагаемой читателю книге довольно подробно освещены вопросы практического применения традиционных мембран. В отношении же трековых мембран это сделано менее полно, а о ядерных фильтрах не упоминается вообще. Однако благодаря своей компактности, абсолютной радиационной безопасности, дешевизне исходного материала и экологической чистоте технологии производство ядерных фильтров, по нашему мнению, в ближайшие 10 лет будет интенсивно нарастать. Подобной ситуации будет способствовать также и одна из особенностей технологии получения ядерных фильтров, позволяющая резко интенсифицировать их производство. Речь идет здесь о возможности одновременного облучения и последующего травления не одного, как это делается сейчас, а многих (десятков и сотен) слоев исходной полимерной пленки. Технология получения ядерных фильтров стремительно развивается в ГДР, Румынии, Франции и ФРГ. Поэтому здесь хотелось бы отметить хотя бы наиболее интересные области использования ядерных фильтров как нового типа мембран.

Уникально малый разброс размеров пор, практически полное отсутствие адсорбции биополимеров на поверхности и внутри пор ядерных фильтров сделали их незаменимыми в производстве вакцин против ряда особо опасных вирусных заболеваний человека и сельскохозяйственных животных (бешенство, клещевой энцефалит, грипп и многие другие) и при получении концентратов вирусов. В промышленных процессах очистки вирусов на ядерных фильтрах используются плоскокамерные мембранные аппараты, обеспечивающие концентрирование 5—20 литров культуральных вирусных суспензий за время 0,5—2 часа. При этом используются обычные для мембранных процессов режимы тангенциального течения жидкости над поверхностью мембран со скоростью 0,1—0,5 м/с. Эти режимы мембранной фильтрации позволяют предотвратить быстрое забивание пор мембран и связанное с ним снижение скорости фильтрации.

Еще одно использование ядерных фильтров в биотехнологии — контроль стерильности биопрепаратов и лекарственных

средств. В книге Т. Брока описаны подобные устройства типа Стеритест, в которых бактериальная микрофлора «вылавливается» из испытуемых растворов традиционными мембранами сетчатого типа. Однако, как показали микробиологические исследования, использование ядерных фильтров в этих приборах более целесообразно вследствие их высокой прочности, устойчивости к склеивающим агентам, а также потому, что материалы, из которых изготавливаются ядерные фильтры, не токсичны для бактерий и других живых клеток. Устройства в виде шприц-насадок с мембранами из ядерных фильтров могут эффективно использоваться для очистки от механических примесей и крупных бактерий лекарственных средств непосредственно перед их инъекцией в организм человека или животного.

Очень интересно новое направление использования ядерных фильтров в медицине, связанное с отделением мембранной фильтрацией форменных элементов крови от плазмы крови (так называемая техника плазмафереза). При переливании крови это позволяет использовать лишь ее плазму, форменные же элементы крови возвращаются обратно донору. При отравлениях и болезнях почек зачастую требуется пропускать кровь через слой адсорбента или диализовать ее в мембранных аппаратах «искусственная почка». Форменные элементы при этих процедурах травмируются. Этого не случается, если подобным процедурам подвергать лишь плазму крови, полученную методом плазмафереза через ядерные фильтры.

Здесь следует заметить, что ядерные фильтры разрешены Министерством здравоохранения СССР для использования их при фильтрационной очистке крови, лекарств, растворов белков, вакцин и других биологически активных препаратов, предназначенных для введения в организм человека.

Пылеулавливатели, различного типа респираторы¹, в конструкциях которых использованы ядерные фильтры, позволяют вести тонкую очистку газов и воздуха от токсичной пыли и от пыли, оказывающей абразивное действие на различные детали двигателей внутреннего сгорания.

«Отфильтровывание» излучений — еще одна область нетривиального использования ядерных фильтров, абсолютно недоступная другим типам пористых мембран. Дело в том, что для практически полного отражения излучений от перфорированной перегородки диаметр отверстий в ней должен быть меньше половины длины волны падающего излучения, а толщина перегородки должна в 2—4 раза превышать диаметр отверстий. Таким

¹ Здесь было бы уместно напомнить читателям о разработанных акад. И. В. Петряновым-Соколовым фильтрующих материалах ФП (фильтров Петрянова).

образом подобный экран, изготовленный из металлизированных ядерных фильтров с диаметром пор меньше 2 мкм, полностью отсекает тепловое излучение, что делает их незаменимыми при изготовлении пористой экранно-вакуумной теплоизоляции для криогенной техники.

Ядерные фильтры оказались идеальным материалом для конечной очистки от микрочастиц в технологиях получения особо чистой воды, используемой для нужд микроэлектронной промышленности. Такие ядерные фильтры с диаметрами пор около 0,2 мкм не только задерживают частицы, размеры которых 0,1—0,2 мкм, но и практически все бактерии. И самое главное, о чем уже говорилось выше, матрица ядерных фильтров в отличие от традиционных мембран не выделяет в фильтрат какие-либо коллоидные частицы или низкомолекулярные примеси.

Этим примером, пожалуй, стоит закончить краткое описание технологических возможностей ядерных фильтров. На самом же деле спектр их применений гораздо шире — например, использование ядерных фильтров как матриц для формирования на основе их пористой структуры различного рода текстур. Но вопросы такого рода выходят за рамки книги о практической мембранной фильтрации, хотя и дают представление о богатстве возможностей и о перспективах использования мембран и методов, основанных на их применении.

Предисловие

Мембранная фильтрация — это один из наиболее широко распространенных лабораторных и промышленных процессов. Однако каких-либо справочников или руководств по квалифицированному использованию этого важного способа разделения и анализа до сих пор не существует. Многие аспекты мембранной фильтрации все еще покрыты тайной (отчасти и потому, что засекречены некоторыми фирмами). В настоящей книге предпринята попытка снять покровы с этих тайн и показать, что собой представляют мембраны и как их можно применять для тех или иных целей.

В той или иной форме мембранная фильтрация применяется уже почти 100 лет, однако лишь с конца 40-х гг. мембранные фильтры начинают выпускать в промышленных масштабах. Используя вначале для бактериологических исследований воды мембраны постепенно начинают применять во многих других областях науки и техники. В 50-е гг. большим шагом вперед явилось использование мембран в биохимии, благодаря чему стало возможным широкое распространение радиоизотопной техники. В 60-е гг. появилось сообщение о первом применении мембран для гибридизации нуклеиновых кислот, а в конце 70-х гг. был разработан метод рекомбинации ДНК, что повлекло за собой широкое использование мембран в генном клонировании.

Появление новых стандартов в фармацевтике вызвало широкое применение мембран для стерилизации лекарственных препаратов и крупномасштабного производства растворов для парэнтерального введения. Мембранные модули патронного типа (фильтр-патроны), первоначально разработанные для фармацевтических целей, в настоящее время нашли применение в различных отраслях промышленности. Стерилизация сыворотки крови с помощью мембранной фильтрации стала важнейшей процедурой при приготовлении питательных сред для исследований в области онкологии и производства вакцин. Получение воды, не содержащей коллоидных частиц, является серьезной проблемой во многих отраслях промышленности, особенно в микроэлектронике, и лишь мембранная фильтрация обеспечивает необходимую чистоту воды. Мембраны наряду с указанными применениями широко используются также для фильтрации воз-

духа — контроля и анализа содержащихся в нем примесей, стерилизации газов.

Цель настоящей книги заключается в ознакомлении читателя с фундаментальными теоретическими основами мембранной фильтрации, материалами, конструкциями и функциями мембран, а также в демонстрации того, как это все реализуется на практике. Предполагается, что читатели этой книги станут потребителями мембранных фильтров, будь то для лабораторных исследований или в промышленности. Изложение материала дается на таком уровне, что книга доступна лицам, завершающим свое образование и намеревающимся работать в различных областях науки и техники; мы надеемся, что она принесет пользу и квалифицированным специалистам.

Данную книгу можно рассматривать одновременно и как справочное руководство, и как учебное пособие по аналитическому и промышленному применению мембранной фильтрации.

В книге приводится перечень почти всех фирм, имеющих то или иное отношение к производству и поставкам мембранных фильтров или различных материалов, из которых изготавливают мембраны. В приложении представлена систематизированная информация, полученная у наиболее крупных фирм — изготовителей мембранных фильтров. Читатели этой книги могут выбрать соответствующий мембранный материал, предлагаемый какой-либо фирмой, и заказать его по соответствующему адресу или получить более подробные сведения непосредственно от самой фирмы. При этом я тщательно избегал давать те или иные рекомендации по выбору какого-то одного из нескольких возможных материалов, будучи уверенным в том, что, получив информацию о различных материалах, читатель сам выберет себе наиболее подходящий для данного конкретного случая.

Я начал писать эту книгу как первый том из серии, посвященной методам микробиологии окружающей среды. Однако, детально ознакомившись с литературой по данному вопросу, обнаружил, что мембранная фильтрация представляет собой самостоятельную область знаний. Поэтому я решил расширить первоначально намеченный круг вопросов и охватить все области ее применения. Это потребовало рассмотрения и тех вопросов, в которых я не чувствовал себя достаточно компетентным. Поэтому мне пришлось обратиться за технической консультацией и содействием к ряду лиц, которых я считал специалистами в мембранных процессах. Они охотно делились со мной своими знаниями, и я надеюсь на то, что их советы и указания добросовестно довел до читателя.

В особенности я обязан Теодору Мельцеру из фирмы «Гелман сайенсиз», поделившемуся со мной подробнейшими замет-

ками и конспектами своих лекций по курсу стерилизующей фильтрации. Я также выражаю глубокую признательность Барбаре Грин, Ричарду Коттону и Тимоти Лихи («Миллипор корпорейшн»); Роберту Кестингу (отделение «Пюропор» фирмы «Гелман сайенсиз»); Уэйну Олсону из «Хайлэнд терапеутикс»; Дэвиду Посту из «Оксоид лимитед»; Рэндаллу Морсу и Джудит Петер (фирма «Шляйхер и Шуль»); Бобу Уотерсону (американское отделение фирмы «Сарториус»); Х. У. Бэлью, прежде работавшему в «Нуклепор корпорейшн»; Роджеру Р. Дэвису («У. Л. Гор и компания»); Шейле Б. Хастон из «Мембран инкорпорейтед», отделение «Гайа»; Филису Энтису из «Кью эй лаборатриз»; Гордону Макфитерсу, Университет шт. Монтана; Джорджу Дж. Васконселосу из Американского агентства по охране окружающей среды и, наконец, Полу Кеннеди из «Амикон корпорейшн» за предоставленную информацию, иллюстративный материал, обсуждение отдельных технических подробностей и за просмотр рукописи настоящей книги.

Предлагаемая книга написана и подготовлена к изданию способом, который отличается от традиционных и в некотором роде вносит коррективы в общепринятую технологию книгоиздания. С целью резкого сокращения времени между завершением работы над рукописью и выпуском книги в свет, а также для того, чтобы поставить автора в прямую зависимость от «конечного продукта», мы решили воспользоваться новейшими достижениями в области полиграфии и автоматизации набора. Книга была сверстана на фотонаборном автомате «Компьюгрэфикс 8600» с использованием программы TEX (Д. Кнут, TEX и METAFONT. Новые тенденции в типографике. Диджитал Пресс и Американское математическое общество, 1979). Предварительно текст был введен мною с клавиатуры терминала на гибкие магнитные диски. При этом в необходимых местах вставлялись соответствующие типографские команды. Записанные на дисках файлы через микродем Хейеса по телефонным каналам связи передавались в ЭВМ «Юнивак 1100». После окончательного редактирования текста на машине (главным образом это касалось уточнения написания отдельных составных терминов) он был набран фотонаборным автоматом. Полосы, содержащие табличный или иллюстрационный материал, набирались в виде гранок, как при обычной технологии. Я глубоко признателен сотруднику Мадисонского академического вычислительного центра Биллу Келли за постоянные советы и личное участие в работе с программой TEX. Сотрудник Американского агрономического общества Доминик Фьюсилло великодушно делился со мной своим опытом применения этой программы. Большую работу по окончательной подготовке текста для фотонаборного автомата выполнила моя жена д-р Кэтрин М. Брок.

Трудности, с которыми мне пришлось столкнуться при реализации этого проекта, не подорвали моего энтузиазма по отношению к новому способу связи текстового процессора с фотонаборным автоматом. Как автору мне в прошлом не раз приходилось огорчаться по поводу слишком большого разрыва во времени между окончанием работы над рукописью и выходом книги в свет, нервничать, читая корректуры. Автоматизацию набора я рассматриваю как средство, сближающее автора с читателем. Уверен, что мои усилия в этой области будут поняты правильно и одобрены.

Томас Д. Брок

Мадисон, шт. Висконсин

Глава 1

Введение

Фильтрация — один из наиболее важных процессов в лабораторных исследованиях и в промышленности. Этот процесс можно определить как разделение системы «твердые частицы — жидкость» пропусканием ее через перегородку из пористого, волокнистого или гранулированного материала. Мембранная фильтрация — это разновидность фильтрации, когда фильтр представляет собой тонкую перегородку толщиной менее 0,1 мм и с высокой степенью пористости. Диаметры пор мембранных фильтров тщательно контролируются и поддерживаются постоянными в процессе их изготовления. Хотя фильтрация исторически является чрезвычайно старым процессом, использующимся еще древними египтянами, которые процеживали виноградный сок через ткань, мембранная фильтрация — процесс относительно новый, получивший широкое распространение лишь после второй мировой войны.

Мембранные фильтры имеют следующие преимущества:

- они не требуют какого-то особого обращения с ними, и их можно легко доставить в любое место, где их предполагают использовать;
- их можно изготавливать одним и тем же способом при точно контролируемых условиях;
- вследствие высокой пористости через них можно пропускать жидкость с большой скоростью потока;
- при помощи мембранного фильтра можно задерживать частицы размерами порядка размеров бактерий и меньше;
- некоторые из них могут работать как сита, т. е. разделять частицы разных размеров.

Мембранные фильтры получили очень широкое распространение в науке и технике. При лабораторных исследованиях их применяют в самых разных областях знания для получения жидкостей, свободных от частиц. В микробиологии мембранные фильтры применяют для выделения микроорганизмов из различных сред, для подсчета колоний микроорганизмов, а также

для быстрого диагностирования индикаторов загрязнения и наличия патогенных организмов. В биохимии мембранные фильтры применяются в качестве пористых подложек при электрофорезе и для связывания нуклеиновых кислот при изучении гибридизации. Они широко используются в клинической практике, в том числе для установления наличия раковых клеток в ткани, при цитологических исследованиях тканевых жидкостей, для приготовления тех или иных лекарственных средств и т. п. В аналитической практике вещества, собранные на фильтре, можно подвергнуть рентгеноструктурному анализу, эмиссионной спектроскопии, микроскопии, гравиметрии или активационному анализу. Мембраны используются во многих аналитических приборах, например в газоанализаторах на кислород, в рН-метрах и электролитическом разделении ионов. В процессах диализа и ультрафильтрации используют по существу те же мембранные фильтры, но с другими размерами пор. Ныне один из самых тонких методов получения высококачественной воды, свободной от ионов, состоит в комбинировании микрофильтрации с обратным осмосом; в последнем случае применяют более тонкопористые мембраны.

Мембранные фильтры находят также очень широкое применение в промышленности. Одним из самых крупных их потребителей является химико-фармацевтическая промышленность (для получения стерильных растворов термолабильных материалов). Различные отрасли промышленности (например, электроника, производство компьютеров, аэрокосмическая промышленность) нуждаются в сверхчистых веществах, которые нетрудно получить с помощью мембранной фильтрации. Ее также применяют при производстве пищевых продуктов и различных напитков.

Большинство мембранных фильтров изготавливают из эфиров целлюлозы, главным образом из нитрата и ацетата целлюлозы, хотя используется большое множество и других исходных веществ, в том числе регенерированная целлюлоза, винил, акрилонитрил, поливинилхлорид, нейлон, полипропилен, поликарбонат и политетрафторэтилен (тефлон). Для некоторых конкретных случаев применения мембранные фильтры во время или после их изготовления могут подвергнуться определенной модификации, а именно можно изменить их цвет (сделав их зелеными или черными вместо белых), нанести на поверхность сеточные маркеры, создать гидрофобное кольцо по краю мембраны и подвергнуть предварительной стерилизации перед упаковкой. Кроме того, мембраны изготавливаются не только в общепринятой форме дисков, но мембранные фильтры могут поставляться также в виде больших листов или фильтр-патронов, последнее имеет место главным образом для промышленного применения.

До того как появились мембраны, для фильтрации применялись в основном так называемые глубинные фильтры. Последние представляют собой сотканые или уложенные таким образом волокна, что фильтруемая жидкость, прежде чем покинуть фильтр, должна пройти длинный извилистый путь. По мере такого сложного движения находящиеся в жидкости частицы удаляются из нее. К числу материалов, из которых делают глубинные фильтры, относятся асбест, бумага, сукно, циновки из соломы, листы из стекловолокна и синтетические ткани. Функции мембранных и глубинных фильтров до некоторой степени совпадают, но первые действуют как чисто поверхностные, при этом удерживаемые частицы остаются сверху матрицы фильтра. Наряду с широким проникновением в практику мембранных фильтров оказалось также необходимым дальнейшее совершенствование и глубинных фильтров как для целей их собственного назначения, так и для использования их в качестве предварительных фильтров в мембранной фильтрации. Хотя главным предметом рассмотрения в настоящей книге является мембранная фильтрация, по мере необходимости мы будем обсуждать и глубинные фильтры.

Мембраны применялись первоначально для фильтрации воды в целях анализа содержащихся в ней загрязнений, однако очень скоро их стали применять также и для фильтрации воздуха. В анализе загрязнения воздуха мембранная фильтрация играет очень важную роль. Поэтому в настоящей книге наряду с обсуждением главной ее темы, а именно процессов фильтрации жидкостей, мы рассмотрим также вопросы, связанные с фильтрацией воздуха (см. гл. 14).

Мембранная фильтрация представляет собой сферу деятельности, которая имеет огромные размеры и играет очень важную роль. Это был один из первых высокотехнологических процессов. С начала 50-х гг., когда впервые в промышленном масштабе была осуществлена очистка воды от загрязнений с применением мембранных фильтров, их производство быстро выросло в крупную отрасль промышленности. Только в США более 20 фирм продают мембранные фильтры, главным образом собственного производства, но существует также ряд европейских и японских фирм. В социалистических странах мембраны изготавливаются в ГДР, СССР и ЧССР. Хотя в настоящее время производство мембранных фильтров достигло почти полного своего развития и установилось в разумных пределах, оно сохраняет свою динамичность, о чем свидетельствует периодическое появление в течение последних 10 лет новых типов мембран. В настоящее время одной из наиболее интенсивно развивающихся областей является разработка мембран для ультрафильтрации и обратного осмоса. Еще одним достижением стало

развитие новых методов оценки структур и свойств мембранных фильтров, которые позволяют использовать эти мембраны более квалифицированно во всем множестве областей их применения.

Одной из причин написания настоящей книги явилась необходимость собрать воедино крайне разрозненные сведения по мембранной фильтрации, имеющиеся в литературе. Мембранная фильтрация касается очень многих разделов знания, и поэтому статьи о ней публикуются в самых различных журналах.

Мембранной фильтрации и смежным с ней процессам был посвящен ряд опубликованных книг, однако они касались главным образом отдельных частных вопросов. В настоящее время нет книги, в которой была бы предпринята попытка охватить все вопросы, относящиеся к мембранной фильтрации, на том уровне, как это сделано в данной книге¹. Надеюсь, читатели обнаружат, что проблемы, возникающие в одной области, могут найти свое решение в другой.

Поскольку терминология по мембранной фильтрации очень обширна и неоднозначна, в конце книги помещен краткий словарь терминов. Приводится также подробная в необходимых пределах информация, касающаяся материалов мембран и изделий из них, предлагаемых различными фирмами-изготовителями. На протяжении всей книги по мере необходимости обсуждаются конкретные фильтры или вспомогательные материалы, а в приложении приведены в алфавитном порядке по наименованию фирм подробные спецификации на материалы фильтров, представляемые различными фирмами-изготовителями. В гл. 5 приведены адреса и основная продукция всех фирм-изготовителей, производящих мембраны и фильтры.

Большинство фирм оказывает существенную техническую помощь потребителям мембран. Поэтому, установив, что какая-то фирма выпускает мембрану или те или иные компоненты мембранного оборудования, потребителю следует связаться с этой фирмой и обсудить необходимые вопросы с ее представителем.

Хотя там, где это требовалось по ходу изложения, и упоминались наименования различных фирм, производящих мембраны, мы не имели в виду, что это может вызвать между ними какую-то конкуренцию. Поэтому читатель должен воспринимать настоящую книгу не как намерение расхвалить конкретную мембрану или какую-либо фирму, а как попытку снабдить его объективной информацией.

¹ В отечественной литературе наиболее полные сведения о мембранах и процессах мембранной фильтрации читатель может найти в книгах: *Дытнерский Ю. И.* Баромембранные процессы.— М.: Химия, 1986; *Дубяга В. П., Перепечин Л. П., Каталевский Е. Е.* Полимерные мембраны.— М.: Химия, 1978; *Начинкин О. И.* Полимерные микрофильтры.— М.: Химия, 1985.— *Прим. ред.*

Глава 2

Структура и действие мембран

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Цель настоящей главы — изложить основные принципы мембранной фильтрации, описать структуры наиболее распространенных типов мембран и, наконец, дать краткое объяснение, как при помощи мембраны из фильтруемой среды можно выделить маленькие частицы вещества. В нашем рассмотрении мы будем считать, что выделяемые частицы имеют размеры менее 100 мкм, причем с наибольшей вероятностью это частицы с размерами порядка 0,1—1 мкм.

Фильтрацию следует отличать от ситования. **Ситование** предполагает разделение частиц большего размера от частиц меньшего размера, тогда как **фильтрация** — это извлечение всех частиц. В настоящей книге мы рассматриваем оба процесса. В повседневной практике для фильтрации используют волокнистые структуры типа сукна или бумаги для отделения более или менее крупных частиц от жидкости, главным образом в целях ее осветления. Мембранная фильтрация, будучи значительно более сложным процессом, применяется для отделения мелких частиц, большая часть которых невидима невооруженным глазом.

Сама мембранная фильтрация подразделяется на ряд самостоятельных областей. Одна из них (**микрофильтрация**) предназначена для выделения частиц, тогда как **ультрафильтрация** — для выделения *молекул* и в первую очередь макромолекул (рис. 2.1). Ультрафильтрация — это старый, широко использовавшийся в химии и биохимии процесс с развитым промышленным применением. В гл. 13 этот процесс рассматривается более подробно. Микрофильтрация же появилась сравнительно недавно и также широко применяется в промышленности, в химических и биохимических исследованиях. Еще один процесс мембранной фильтрации — **диализ** — предназначен для отделения совсем небольших молекул с размерами порядка размеров ионов. Как показано в гл. 13, в некоторых случаях диализ проводят в обратном направлении, тогда он называется **обратным осмосом**.

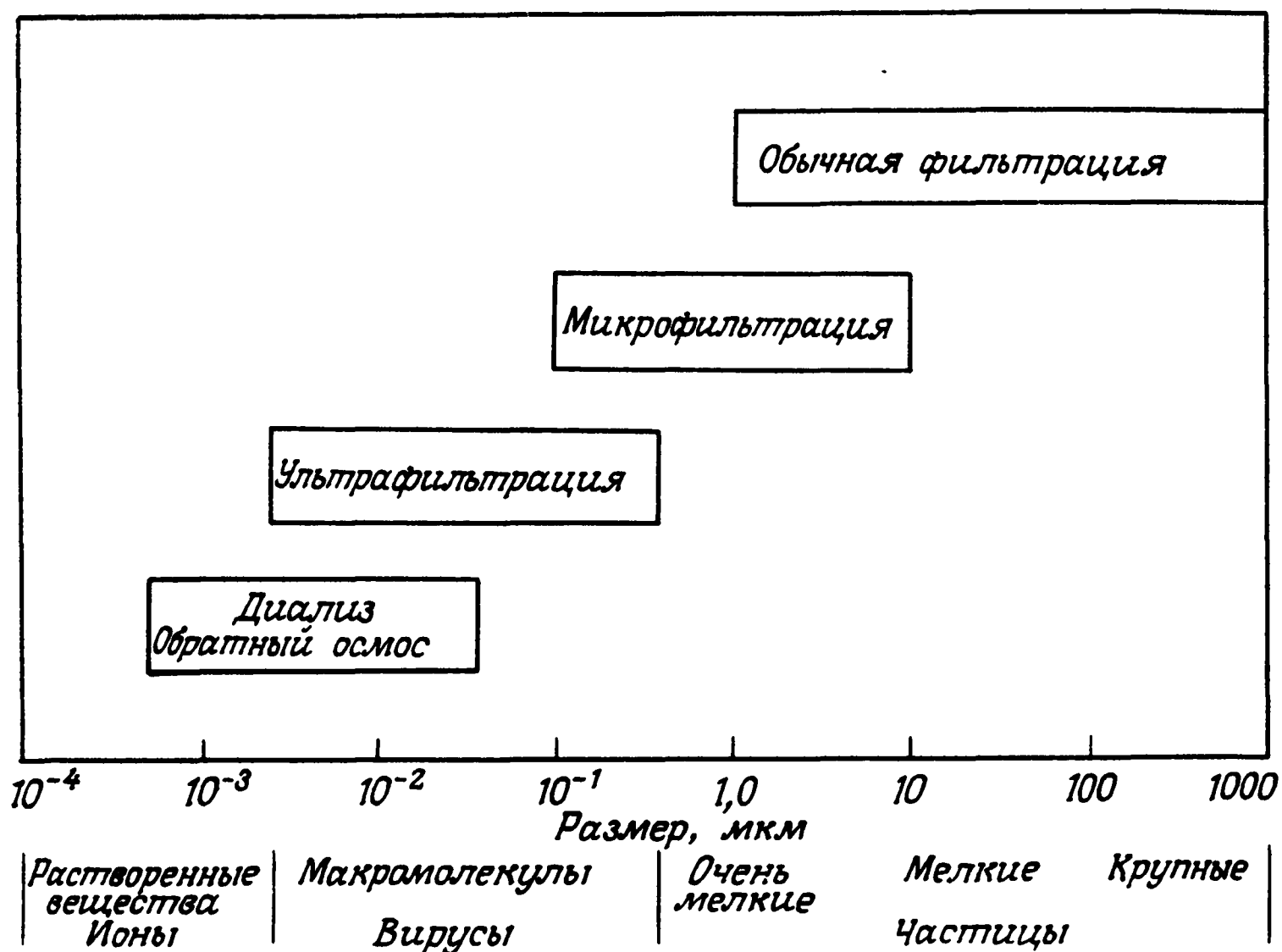


Рис. 2.1. Наиболее распространенные процессы фильтрации. Для микрофильтрации, фильтрации, диализа и обратного осмоса используются мембраны. Для обычной фильтрации применяют, как правило, фильтры из бумажного или стеклянного волокна. (Согласно работе [125].)

2.2. РАЗМЕРЫ ЧАСТИЦ

Размеры частиц, с которыми мы имеем дело при мембранной фильтрации, имеют чрезвычайно широкие пределы (рис. 2.2). Например, размеры некоторых из самых больших микробных клеток более 10 мкм, а таких биологических объектов, как частицы пыли, более 100 мкм. Ближе к нижней границе этой шкалы находятся частицы клеточного уровня — отдельные бактерии имеют размер менее 0,3 мкм. Мембраны нередко используются также в вирусологии (см. гл. 12), и тут мы имеем дело с частицами еще меньших размеров — порядка 10 нм. Для удаления частиц из воздуха также применяются мембраны. В загрязненном воздухе находится множество вредных частиц, и даже чистый воздух содержит различные частицы. Фильтрационную очистку воздуха мы рассмотрим в гл. 14.

Необходимо помнить о том, что большинство частиц не являются сферическими. Частицы в форме палочек имеют длину и поперечник. Которая же из этих величин играет более важную роль в фильтрации? Это зависит в некоторой степени от того, как ведет себя отдельно взятая частица в процессе фильтрации.

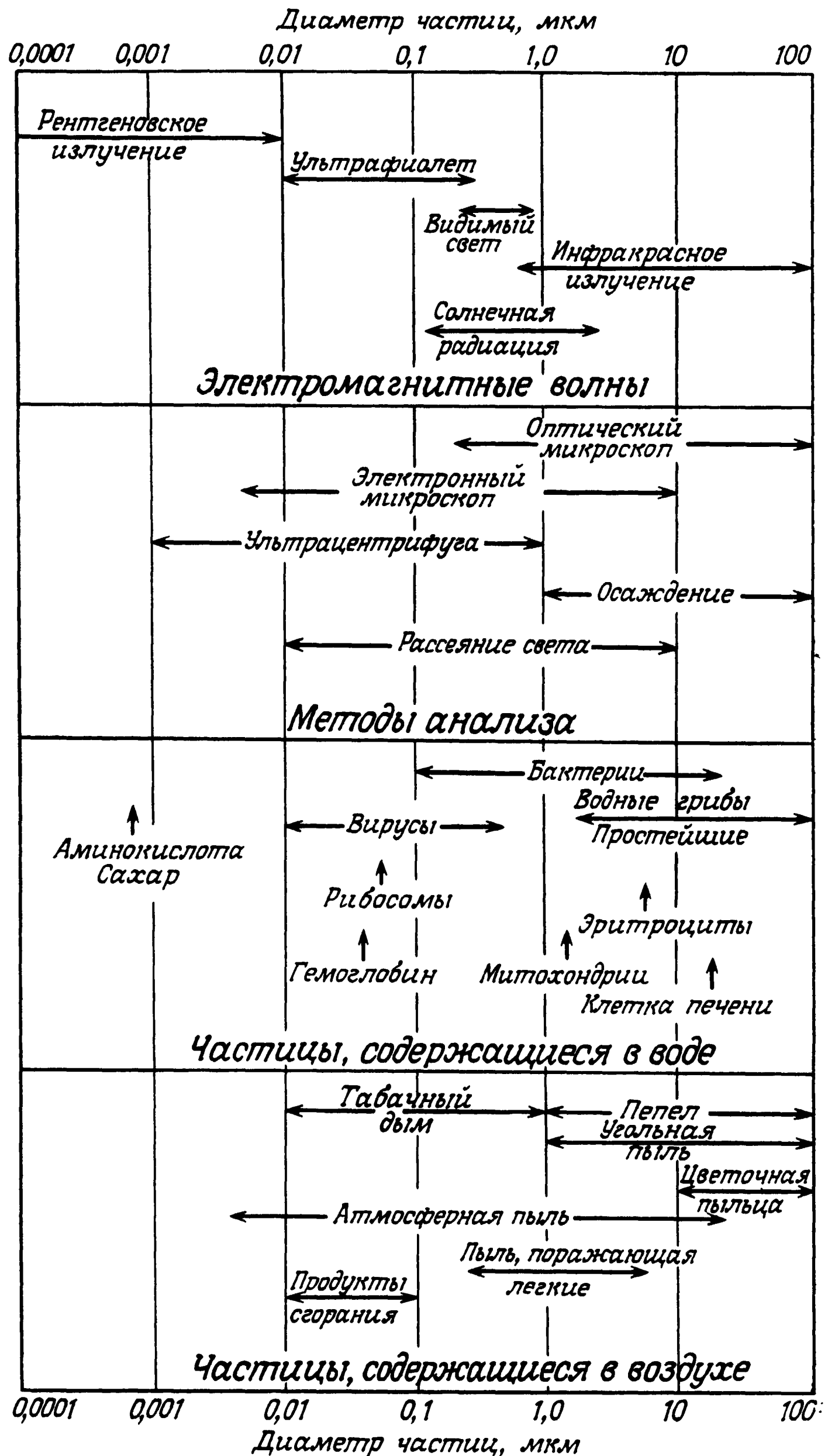


Рис. 2.2. Размеры частиц в воде, а также в воздухе и соответствующие методы анализа.

Если она подходит к мембране перпендикулярно ее плоскости, то лимитирующим является поперечник, если же под углом, — то длина частицы. Поскольку в процессе фильтрации анализируемые частицы представляют собой статистический ансамбль, не столь уж существенно, как будет проходить мембрану отдельно взятая частица; важное значение имеет то, как все частицы будут вести себя в среднем. Поэтому мы будем говорить о *номинальном* размере частицы; под этим мы будем подразумевать размер сферической частицы, которая ведет себя на мембране аналогично исследуемым нами частицам. Важно помнить о том, что в действительности частицы почти никогда не являются идеальными, так что любые размеры, о которых идет речь, можно считать лишь средними, или номинальными.

Содержание частиц в жидкости может быть выражено либо через их число, либо через их массу. Если для каких-то целей важную роль играют размеры частиц, то содержание можно выразить через распределение частиц по размерам. Например, можно разбить размеры на несколько размерных интервалов (классов), после чего подсчитать число частиц внутри каждого из этих интервалов. Таким образом можно построить гистограмму, показывающую наглядно, сколько частиц содержится в каждом из размерных классов. При фильтрации жидких систем распределение частиц по размерам, как правило, установить не удастся, однако в случае фильтрационной очистки воздуха знание такого распределения очень важно; подробнее этот вопрос рассматривается в гл. 14 (разд. 14.2; см., в частности, рис. 14.3).

2.3. ТИПЫ ПОРИСТЫХ ПЕРЕГОРОДОК

Существуют четыре основных типа пористых перегородок, структуры которых изображены на рис. 2.3: сеточный, глубинный, микро- и ультрафильтр. Наиболее простым среди них является **сеточный, или ситчатый фильтр**, например из нейлона, который используют для выделения водорослей или мелких животных из океанической или озерной воды (рис. 2.3, а). Такой фильтр обычно задерживает частицы диаметром порядка 60 мкм.

Другим широкоизвестным фильтром, используемым для обычного осветления, является **глубинный фильтр**. Он представляет собой волокнистый лист или мат, сделанный из бумаги, асбеста или стекловолокна (рис. 2.3, б), причем расположение волокон относительно друг друга является произвольным. Глубинный фильтр действует главным образом так, что частицы по мере прохождения ими через него задерживаются в извилистых

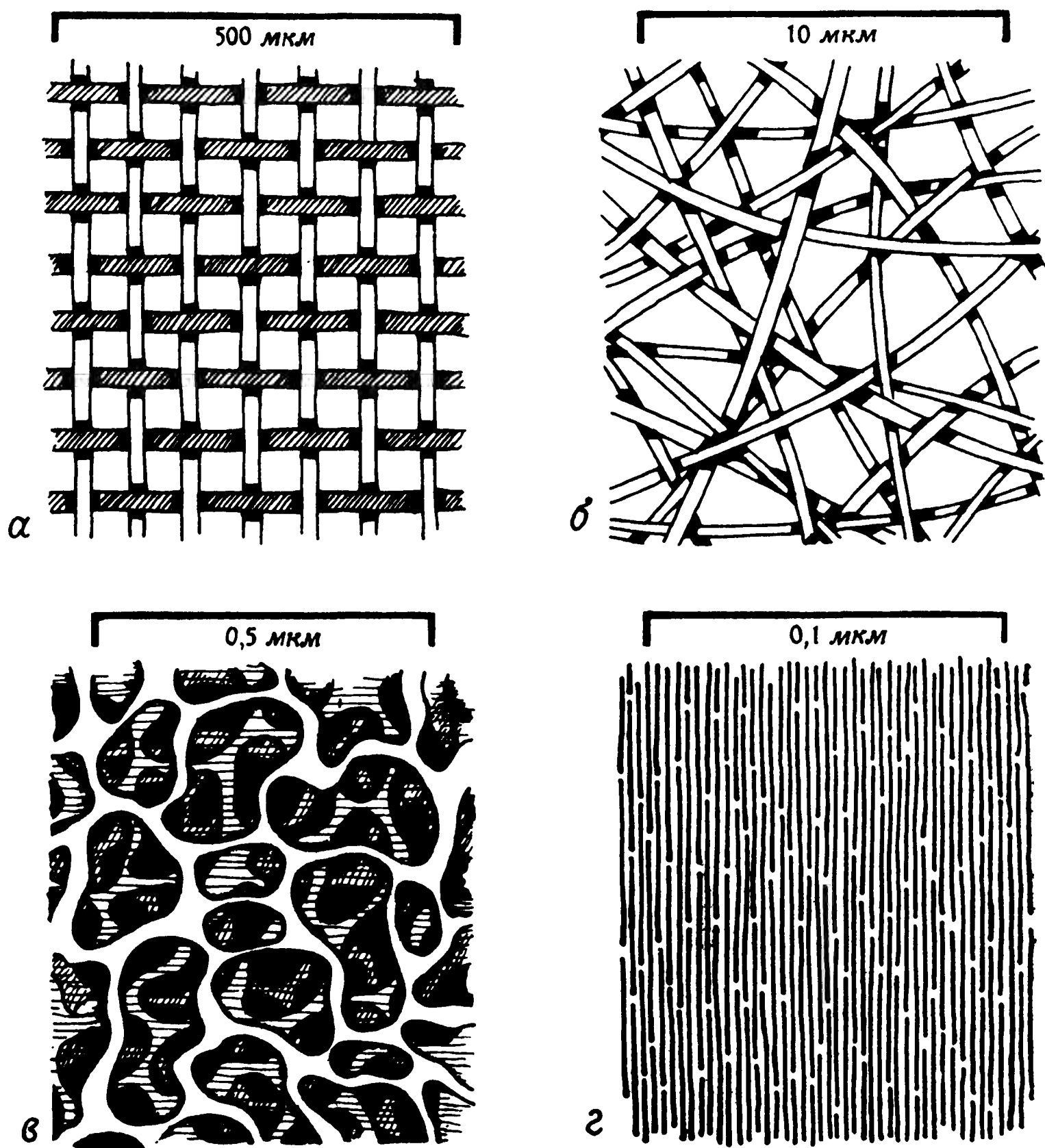


Рис. 2.3. Структуры пористых перегородок различных типов. а — тканая сетка; б — целлюлозный или стекловолоконный фильтр; в — микропористая мембрана; г — плотная полимерная пленка.

каналах, пронизывающих всю толщину фильтра. Для изготовления глубинных фильтров используют бумажное, асбестовое, стеклянное, шелковое, шерстяное, металлическое, нейлоновое, полиэфирное, вискозное, графитовое, керамическое, кварцевое и каучуковое волокно, мех или волос, пеньку, джут, холст, ацетилцеллюлозные нити, титанат калия. В отдельных случаях волокна скрепляются пластиковым жгутом или клеем, после чего спрессовываются в круглые листы или слои, либо формуются в патроны.

Хотя и можно сделать такие глубинные фильтры, которыми можно извлекать из систем маленькие частицы, подобные вирусам или бактериям (см. гл. 12), по сравнению с мембранными

фильтрами они имеют значительные ограничения. Они применяются главным образом для предварительной фильтрации в целях задержки крупных частиц, чтобы уменьшить забивание мембранных фильтров; этот вопрос рассматривается в гл. 6 и 7.

Одна из модификаций глубинного фильтра предполагает использование некоторого вещества, называемого **вспомогательным** и наносимого на поверхность основного материала фильтра. В качестве такого вспомогательного вещества используются, например, диатомовая земля и перлит (вулканическое стекло, измельченное в пудру). В случае фильтрации жидкости вспомогательное вещество наносят сначала тонким слоем на поверхность материала основного фильтра, а затем добавляют небольшое его количество в фильтруемую жидкость, так что в процессе фильтрации продолжает образовываться слой вспомогательного вещества¹.

Для выделения частиц, которые на размерной шкале принадлежат области ультрафильтрации, используются **ультрафильтры**. Обычно это полимерные пленки, которые имеют плотную структуру с размерами пор порядка размеров молекул, причем поры распределены плотно и регулярно (рис. 2.3, *г*). Такой фильтр оказывает очень большое сопротивление потоку жидкости. Наконец, **микрофильтры**, которые применяются в обычных процессах фильтрации частиц, имеют очень сложную открытую структуру коллоидного типа² (рис. 2.3, *в*).

Различие в структуре глубинного фильтра, сделанного из стекловолокна, асбеста или бумаги, и полимерной мембраны показано на рис. 2.4. Большинство частиц при фильтрации глубинным фильтром выделяется не на его поверхности, а оказывается прилипшими к волокнам внутри каналов, образующих целый лабиринт (см. рис. 2.10). В случае же мембранной фильтрации большинство частиц остается на поверхности мембраны, и их проникновение в глубь матрицы либо очень мало, либо вовсе отсутствует. Глубинные фильтры характеризуются высокими скоростями пропускаемых через них потоков жидкости, устойчивы против забивания и используются главным образом для осветления жидкостей и извлечения крупных частиц. Мембранные же фильтры обеспечивают (относительно) низкие скорости потока, легко забиваются и применяются в основном для выделения мелких частиц. Частицы, задержанные глубинным фильтром, остаются внутри него, поэтому их трудно наблюдать или подвергнуть анализу, в то время как частицы

¹ Описанная технология используется также для получения так называемых динамических мембран.— *Прим. ред.*

² Следует заметить, что микрофильтры, изготовленные методами ядерной физики, имеют очень простую структуру (см. рис. 2.5).— *Прим. ред.*

выделенные мембранным фильтром, остаются на его поверхности, что делает их доступными для анализа и изучения (табл. 2.1).

Хотя большинство мембранных фильтров делают из какого-либо одного полимера, некоторые из них являются составными, т. е. представляющими собой двухслойную систему, один слой которой изготавливается из более прочного, но с большими размерами пор материала и называется подложкой, а другой делается из более хрупкого материала, непосредственно осуществляющего фильтрацию.

Мембранный фильтр следует также сравнить с фильтрами из сплавленных частиц стекла или фарфора, которые прежде использовались для стерилизации. Эти фильтры получаются путем сплавления или спекания друг с другом маленьких частиц фильтрующего материала (например, стекла или фарфора) под воздействием тепла. Поры в получаемом таким образом фильтре представляют собой области пространства, которые образуются между частицами после процесса сплавления. Большая часть объема сплавленного фильтра занята фильтрующим материалом, и лишь очень маленькую его часть занимают поры.

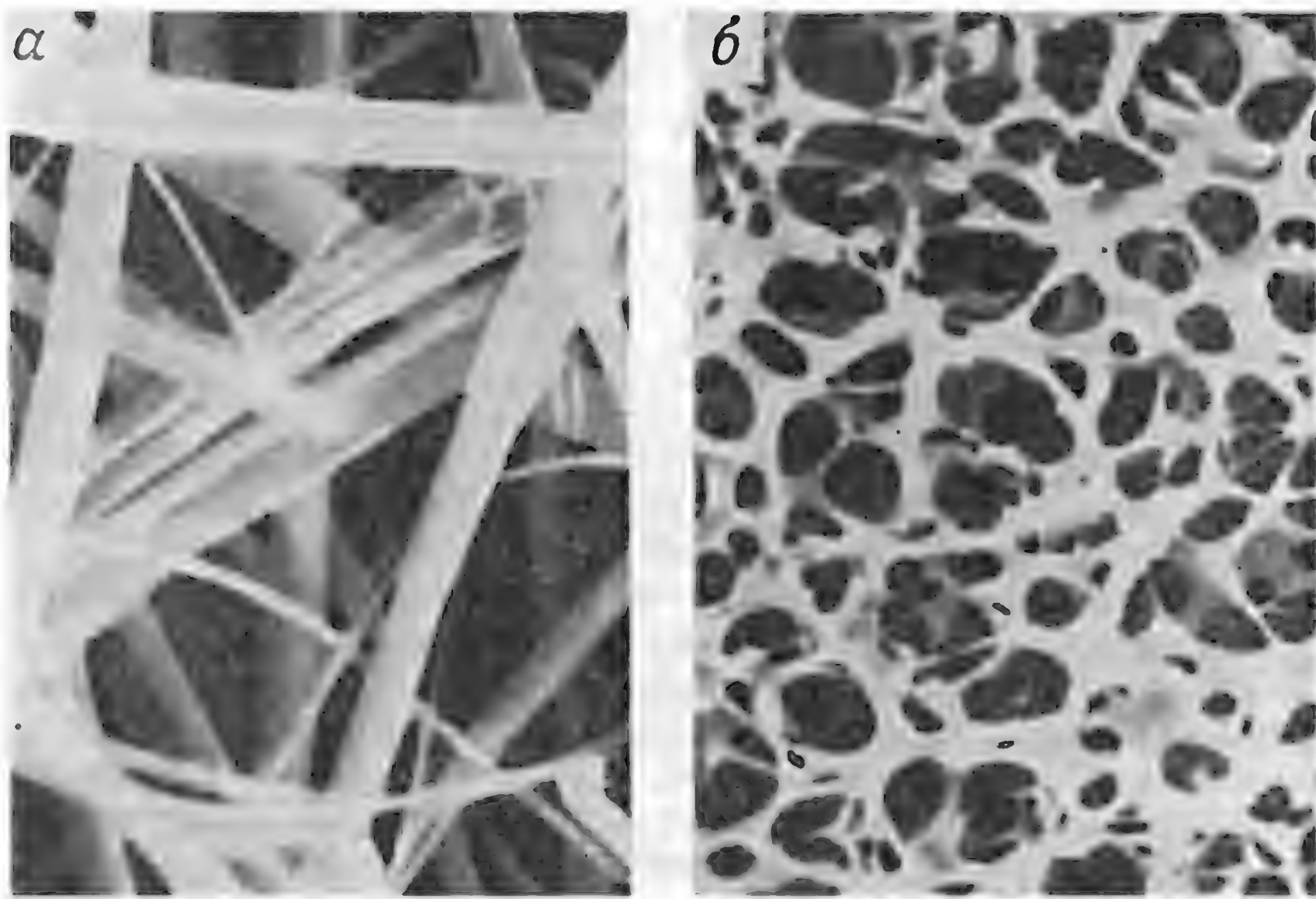


Рис. 2.4. Микрофотографии фильтров и мембран, полученные на сканирующем электронном микроскопе. *а* — глубинный фильтр из стекловолокна; *б* — мембрана из триацетата целлюлозы с размером пор 0,2 мкм. (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз»).

Поэтому такой фильтр имеет низкую пропускную способность. Из-за низкой скорости фильтрации эти фильтры были в большинстве своем вытеснены мембранными фильтрами, за исключением особых случаев, таких, как фильтрация коррозионных или очень горячих жидкостей. Исторически сплавленные фильтры сыграли большую роль в развитии микробиологии, а открытие самого факта существования вирусов оказалось возможным благодаря наличию и использованию этих фильтров.

Таблица 2.1. Сравнительные характеристики мембранного фильтра и глубинного фильтра, изготовленного из стекловолокна.

Мембранный фильтр	Глубинный фильтр
Задерживает все частицы, размеры которых превышают размер пор	Размеры пор обычно не указываются, эффективность определяется как количество проникающих частиц, выраженное в процентах от исходного количества частиц
Четко определенная микропористая структура	Структура из случайным образом расположенных волокон
Задержка частиц на поверхности матрицы	Задержка частиц внутри матрицы
Ограниченная производительность по фильтруемой жидкости	Высокая производительность по фильтруемой жидкости
Целостность проверяется методом пузырька	Методом пузырька проверен быть не может
Не выделяет волокна в фильтрат	Выделяет волокна в фильтрат
Стабилен до 130 °С	Стабилен до 500 °С
Чувствителен ко многим органическим растворителям	Устойчив к действию всех органических растворителей
Микроорганизмы остаются на поверхности, поэтому возможно их культивирование и подсчет колоний	Микроорганизмы не задерживаются на поверхности
Имеются мембраны с размером пор до 0,1 мкм и меньше	Номинальный размер задерживаемых частиц до 0,7 мкм

В некоторых отдельных случаях может понадобиться изготовить мембранный фильтр прямым наложением на пористую подложку. Процесс получения таких мембран ведется *in situ*, а сами мембраны называют динамическими. Применение динамических мембран исключает требование того, чтобы они были обязательно целыми и обладали какими-то конкретными фильтрующими характеристиками. Их применяют в промышленности в специальных целях, однако совсем не используют в лабораторных исследованиях. Одним из видов динамических мембран являются жидкие мембраны — их активная фильтрующая поверхность образуется¹ в результате желатинирования содержащегося в фильтруемой жидкости вещества. Жидкие

¹ Жидкие мембраны могут быть образованы на пористой подложке при фильтрации через нее растворов, содержащих поверхностно-активные вещества. — Прим. ред.

мембраны еще не вышли из стадии экспериментальной разработки; они найдут применение главным образом в некоторых процессах ультрафильтрационного разделения (см. гл. 13).

2.4. СТРУКТУРА МЕМБРАН

Мембраны, используемые в фильтрации частиц, имеют открытую структуру, т. е. лишь небольшая часть объема мембраны занята самим полимером. У типичных мембран открытые поры занимают примерно 80—85 % ее объема. Такая пористость обеспечивает довольно высокую скорость потока фильтруемой жидкости через мембранный фильтр. До появления растровой электронной микроскопии считалось, что мембраны имеют цилиндрические поры строго определенных размеров, но исследование мембран под растровым электронным микроскопом обнаружило, что структура мембраны в значительной степени произвольна, а поры могут иметь любое сечение, кроме круглого (рис. 2.4, б).

Даже теперь в технической документации отдельных фирм, изготавливающих мембраны, предполагается, что поры имеют цилиндрическую форму. Это неправильно; исключение составляют лишь трековые мембраны, полученные методами ядерной физики, например мембраны Нуклепор, которые мы рассмотрим ниже. Кроме того, хотя мембрана является достаточно тонкой (ее толщина обычно около 150 мкм), с точки зрения фильтруемой частицы она представляется довольно толстой. Структура поверхности мембраны обычно несколько отличается от структуры ее матрицы, и это отличие зависит от способа отливки, которым была получена мембрана (см. разд. 3.3). Кестинг [125] рассматривает мембрану как когезионную систему, имеющую вид «пены с открытыми пузырьками или вакуолей с разрушенными стенками... Связывающими воедино всю эту клеточную структуру являются идущие во всех направлениях длинные прожилки, похожие на глобулы и цепочки». Таким образом, диаметры пор не имеют прямого отношения к размеру выделяемых из фильтруемой жидкости частиц, поскольку форма пор является в действительности щелевидной, а не цилиндрической.

Среди типичных мембранных фильтров с открытоячеистой пенообразной структурой¹ исключение составляют трековые мембраны фирмы «Нуклепор»; их получают протравливанием

¹ Этот же тип структуры имеют ядерные фильтры, треки в которых получают облучением полимерных пленок нерадиоактивными однородными ускоренными тяжелыми ионами.— *Прим. ред.*

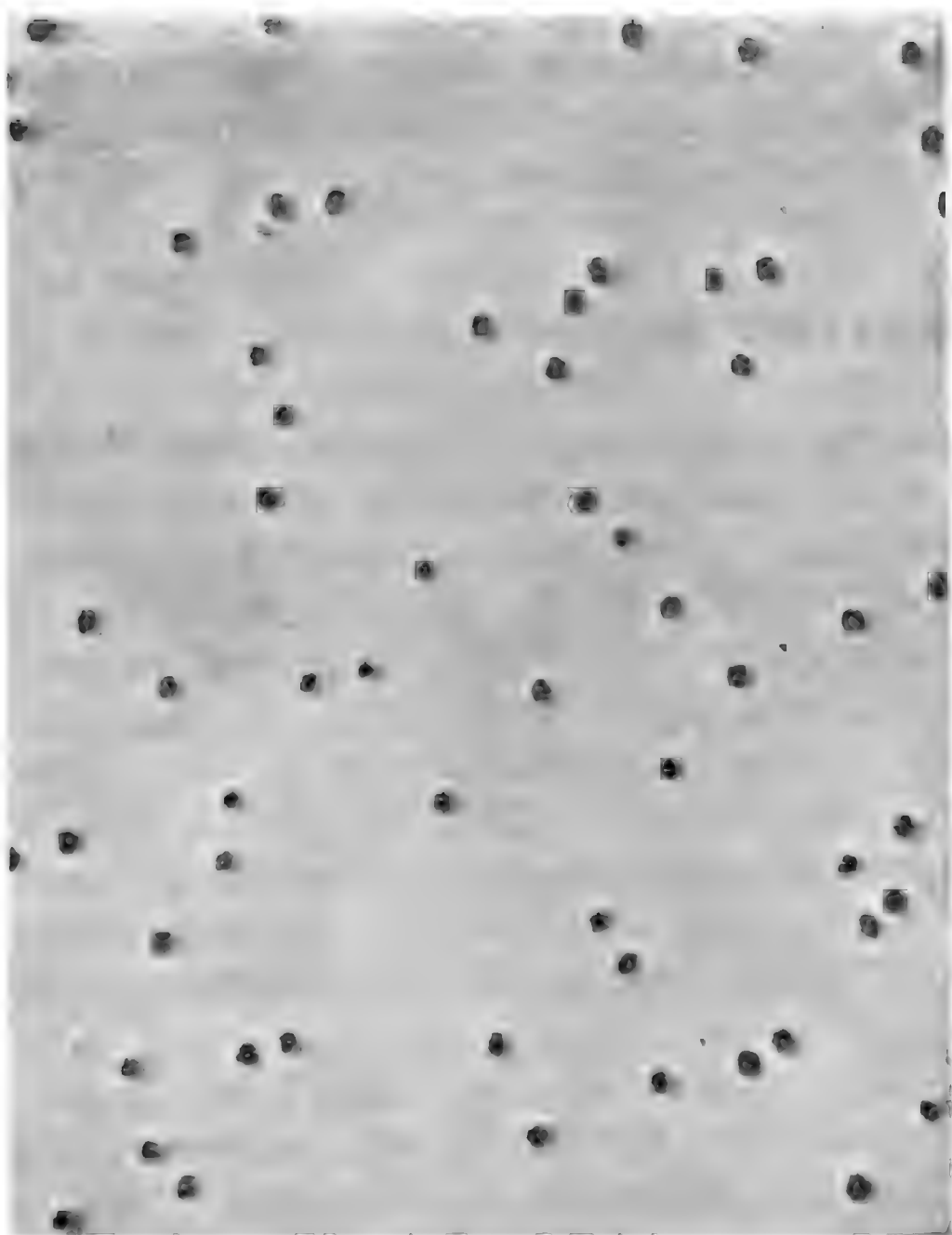


Рис. 2.5. Микрофотография трековой мембраны с размером пор 0,2 мкм, полученная на сканирующем электронном микроскопе. (С разрешения фирмы «Нуклепор корпорейшн»).

треков, образующихся в поликарбонатной пленке в результате облучения ее осколками деления [75]. Эти мембраны, которые являются почти идеальными ситами, имеют истинную порообразную структуру (рис. 2.5); в некоторых специальных случаях применения они оказываются значительно более подходящими по сравнению с другими мембранами.

2.5. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАН

Хотя точная характеристика мембран и их стандартизация рассматриваются в гл. 4, здесь следует упомянуть некоторые характеристики мембран с целью облегчения понимания процесса фильтрации. Несмотря на то что фирмы-производители предпринимают усилия, для того чтобы поры в мембране имели небольшой разброс по размерам, в любой мембране размеры пор имеют некоторое распределение. Объем пустот (пор), или пористость, составляет ту часть объема мембраны, которая доступна фильтруемой жидкости. Хотя большая часть пор в мембране может быть открытой и взаимосвязанной, некоторые мембраны могут иметь закрытые поры, которые не соединя-

ются с основными каналами, и, следовательно, их можно не обнаружить при измерениях объема порового пространства мембраны. В большинстве целлюлозных мембранных фильтров, предлагаемых промышленностью, поры занимают около 80 % общего объема, что позволяет пропускать через них потоки жидкости с большой скоростью. Следует заметить, что та часть жидкости, которая задерживается в порах, как правило, теряется, поскольку ее бывает трудно оттуда извлечь. Поэтому, если нужно профильтровать небольшое количество дорогостоящей жидкости, довольно большая ее часть окажется потерянной в порах мембраны. Чтобы несколько снизить остроту этой проблемы, следует применять мембраны небольшого диаметра. Число пор на единице площади мембранной поверхности называется **плотностью пор**. Как правило, этот показатель у большинства выпускаемых промышленностью мембран составляет 10^8 — 10^9 пор на квадратный сантиметр. Следует подчеркнуть, что *диаметры пор, указываемые в технической документации к мембранам, получены не непосредственно из прямых измерений с помощью электронного микроскопа, а найдены косвенно путем расчетов на основе физических и биологических измерений*; этот вопрос обсуждается в гл. 4. Кроме того, приводимые значения диаметров пор являются средними и существует разброс значений относительно этого среднего (фирмы-изготовители обычно не приводят величину стандартного отклонения). Следует также обратить внимание на различие понятий *размер пор* и *пористость*. Пористость — это степень открытости мембраны, которая характеризуется количественно величиной объема пустот в ней, тогда как под размером пор мы понимаем средний диаметр отдельных пор.

Еще одной важной характеристикой мембран с точки зрения их применения является **смачиваемость**. Мембранам из эфиров целлюлозы и некоторых пластиков присуща гидрофобность, поэтому они сами по себе несмачиваемы. Фирмы, производящие такие мембраны, могут сделать их смачиваемыми добавлением специальных смачивающих агентов, которые, однако, могут стать источником нежелательных примесей в фильтруемых растворах. Вода может пройти через гидрофобную мембрану при достаточно высоких давлениях, но при работе с мембранами, имеющими размер пор менее 1 мкм, требуются столь высокие давления, что осуществлять это оказывается чрезвычайно трудно.

Мембраны могут быть достаточно однородными по всей толщине: от верхней их стороны к нижней; такие случаи мембраны называют **изотропными**. В других случаях структура мембраны от одной ее стороны до другой может сильно отличаться, и тогда ее называют **анизотропной** [125]. Некоторая

степень анизотропности неизбежна, она является следствием технологии производства мембраны (например, при отливке на твердых поверхностях сторона мембраны, оказавшаяся наверху, будет по своей структуре отличаться от другой стороны мембраны). У большинства мембран одна из сторон является несколько более глянцевой; это та сторона мембраны, которая в процессе отливки была обращена к воздушному пространству. Потоковые характеристики мембраны обычно лучше при прохождении жидкости от верхней ее стороны к нижней, так что в фильтрующем аппарате желательно располагать мембрану глянцевой стороной вверх. У некоторых мембран намеренно повышают степень их анизотропии, чтобы улучшить фильтрующие или другие характеристики. Например, мембрана НС фирмы «Миллипор», выпускаемая для анализа загрязнения воды, имеет значительно более открытую структуру на поверхности, чем в матрице, что позволяет бактериям проникать внутрь мембраны на небольшую глубину, прежде чем они окажутся задержанными (см. разд. 10.6). Полученное с использованием такой мембраны более высокое число отсчетов клеток при анализе на содержание фекальных кишечных палочек (ФКП) [198] обусловлено тем, что в режиме стрессового культивирования бактерии, проникшие частично внутрь матрицы мембраны, имеют лучшие условия для роста, чем те, которые остались на поверхности мембраны, где стрессовые условия (высушивание и другие факторы, разрушительно действующие на бактерии) проявляются наиболее резко. Отделение Пьюропор фирмы «Гелман Сайенсиз» выпускает для подобных целей специальные мембраны с высокой степенью анизотропности под названием Тиран М/Е (см. разд. 4.3).

Большинство мембран в сухом виде имеет большой отрицательный электростатический заряд; согласно сообщениям, разность потенциалов может достигать значений до 300 вольт (см. разд. 14.3). Такой статический заряд может привести к ошибке при взвешивании¹. Снять заряд с мембраны можно, если облучить ее альфа-частицами, получаемыми в специальных излучателях, которые продаются фирмой «Нуклепор» наряду с другими фирмами.

В некоторых применениях следует учитывать еще одну характеристику мембран, а именно показатель преломления материала мембраны. Белизна мембран объясняется тем, что показатели преломления воздуха внутри пор и полимерной матрицы сильно различаются по величине, а это приводит к рас-

¹ Действительно, к ошибкам при взвешивании может привести адгезия, например частиц пыли на поверхности мембран.— *Прим. ред.*

сеянию проходящего через мембрану света. Мембраны из нитро- и ацетилцеллюлозы имеют показатели преломления, равные соответственно 1,51 и 1,47. После высушивания мембрану можно сделать прозрачной, заполнив ее поры какой-либо жидкостью типа парафинов, например вазелиновым или иммерсионным маслом, применяемым при микроскопировании.

2.6. КАК РАБОТАЕТ МЕМБРАНА

Хотя мембранная фильтрация кажется процессом простым, в действительности она очень сложна [144, 197].

Наши представления о том, как протекает мембранная фильтрация, изменялись по мере углубления наших знаний о структуре мембран и с приобретением опыта в связи с расширением областей ее применения. Образ наших мыслей определяется также и тем, что нас интересует больше — извлечение ли большинства частиц, содержащихся в суспензии, или стерилизующая фильтрация, при которой должны быть извлечены все частицы. Механизм стерилизующей фильтрации подробно обсуждается в гл. 7.

Короче говоря, при прохождении через мембрану жидкости, содержащей частицы другого вещества, образуется сложная проточная система; через поры мембраны перемещаются маленькие струйки жидкости, которые выходят с противоположной стороны. Жидкость свободнее проходит через более крупные поры, поэтому они первыми вовлекаются в процесс фильтрации. Частицы, взвешенные в жидкости, движутся в ее потоке по инерции. Если частицы достаточно малы, чтобы пройти сквозь поры мембраны, то они покидают последнюю с противоположной стороны и становятся частью фильтрата. Остальные частицы либо остаются на поверхности мембраны, либо задерживаются внутри матрицы. Схематически процесс мембранной фильтрации изображен на рис. 2.6.

То, что частицы, размеры которых больше размеров пор, задерживаются мембраной, вполне понятно, однако мембраной извлекаются также многие из частиц с размерами, меньшими, чем размеры пор. Как же это происходит? Если частица немного меньше поры и проходит неподалеку от нее, то существует определенная вероятность того, что она коснется матрицы мембраны своим *краем*. Если сила сцепления достаточно велика (см. ниже), то частица захватится матрицей. Извлечение частиц, размеры которых значительно меньше размеров пор, возможно лишь в том случае, если на них действует некоторая сила *притяжения* со стороны поверхности мембраны.

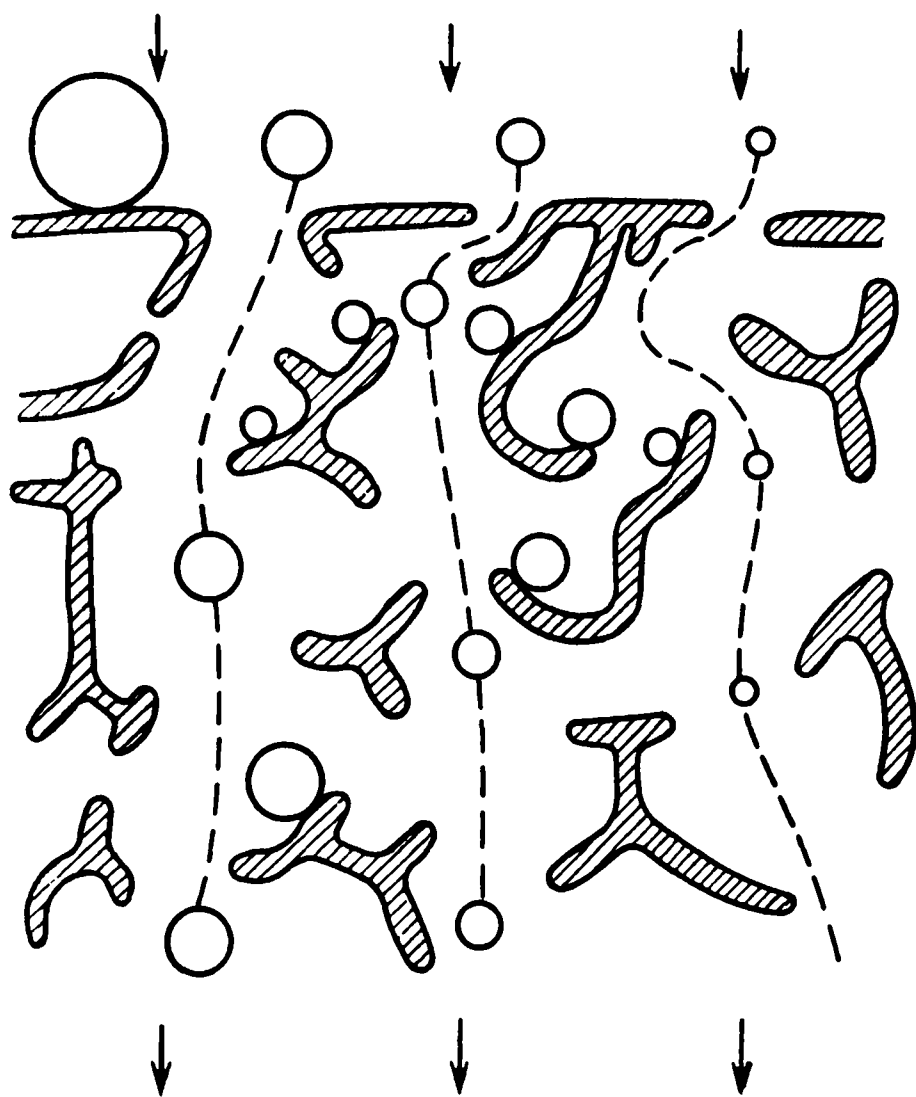


Рис. 2.6. Механизм мембранной фильтрации. Частицы, размеры которых превышают размеры пор, задерживаются поверхностью мембраны (отсеиваются). Частицы с меньшими, чем у пор, размерами входят в матрицу мембраны. Они могут либо пройти сквозь нее и попасть в фильтрат, либо застрять внутри матрицы мембраны и остаться вне фильтрата. (Согласно работе [100].)

Для описанного соотношения размеров единственной такой силой является электростатическая (см. ниже).

Теперь после такого достаточно простого описания процесса¹ мембранной фильтрации мы можем перейти к некоторым более сложным вопросам.

1. Длина поры гораздо больше ее ширины, поэтому в удержании частиц важную роль играет явление поверхностной адсорбции внутри пор. Сладек и Лихи [197] измерили с помощью микроскопа глубину проникновения мелкой бактерии (*Pseudomonas diminuta*) в матрицу мембран и показали, что, прежде чем быть удержанной, бактерия может проникнуть в глубь мембраны на достаточно большое расстояние. Как видно из рис. 2.7, глубина проникновения частиц в крупные поры значительно больше глубины проникновения в мелкие, а в мембранах с порами диаметром 0,2 мкм проникновение вовсе не наблюдалось. Эти результаты свидетельствуют о том, что в зависимости от соотношения размеров частиц и пор мембранный фильтр можно рассматривать либо как глубинный, либо как экран. Когда поры достаточно малы, все частицы задерживаются мембраной, в то время как при несколько больших размерах пор некоторые из частиц задерживаются ею благодаря адсорбции.

2. Мембрана — не просто сито. В задержке частиц важную

¹ На самом деле происходящие здесь процессы много сложнее. Читателю, интересующемуся этим вопросом, мы рекомендуем книгу: Дерягин Б. В., Чураев Н. В., Муллер В. М. Поверхностные силы.— М.: Наука, 1985.

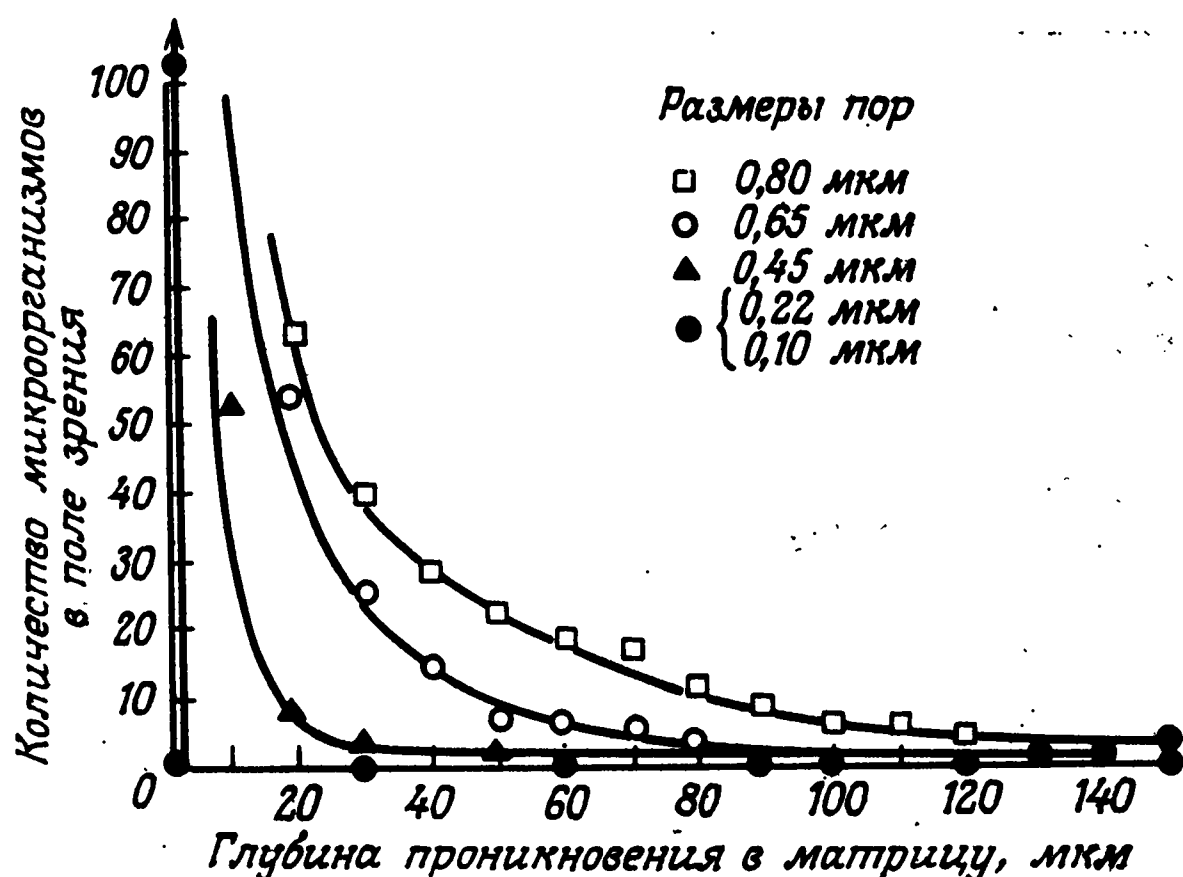


Рис. 2.7. Проникновение мелких бактерий (*Pseudomonas diminuta*) в мембранные фильтры с разными размерами пор. Измерения проводились с помощью подсчета под микроскопом окрашенных бактерий на различных расстояниях от поверхности в глубь мембраны через каждые 10 мкм. (Неопубликованный ранее рисунок с разрешения Т. Лихи, фирма «Миллипор корпорейшн».)

роль играют капиллярный эффект и явление адсорбции. Так, в случае когда размеры пор мембраны больше размеров частиц, последние не всегда свободно проходят через мембрану [242]. Большое влияние могут оказывать на взаимодействие частиц с матрицей мембраны электростатические и вандерваальсовы силы. Если рН смачивающей мембрану жидкости превышает 2-3, то в большинстве случаев поверхность мембраны имеет отрицательный заряд [202], а поскольку клетки, вирусы и большая часть макромолекул в нейтральной области рН также заряжены отрицательно, начинают действовать электростатические силы отталкивания, которые могут превышать вандерваальсовы силы притяжения. Особенно значительно этот эффект проявляется при фильтрационных работах с вирусами (см. гл. 12).

3. Роль электростатических сил можно наглядно проиллюстрировать на примере глубинного фильтра, который задерживает фильтруемые частицы по механизму адсорбции. Асбестовые волокна несут большой положительный заряд и, следовательно, с очень большой эффективностью задерживают отрицательно заряженные частицы (рис. 2.8а). На протяжении многих лет асбестовые глубинные фильтры использовали для стерилизации и осветления (знаменитые фильтры Зейтца сделаны из асбеста). Однако асбест небезопасен при попадании в дыхательную и пищеварительную системы организма,



Рис. 2.8а. Асбестоволоконный фильтр при большом увеличении; видна сильная связь отрицательно заряженных частиц с положительно заряженными волокнами. Самые крупные волокна имеют диаметр до 0,2 мкм. (С разрешения фирмы «Нуклепор корпорейшн».)

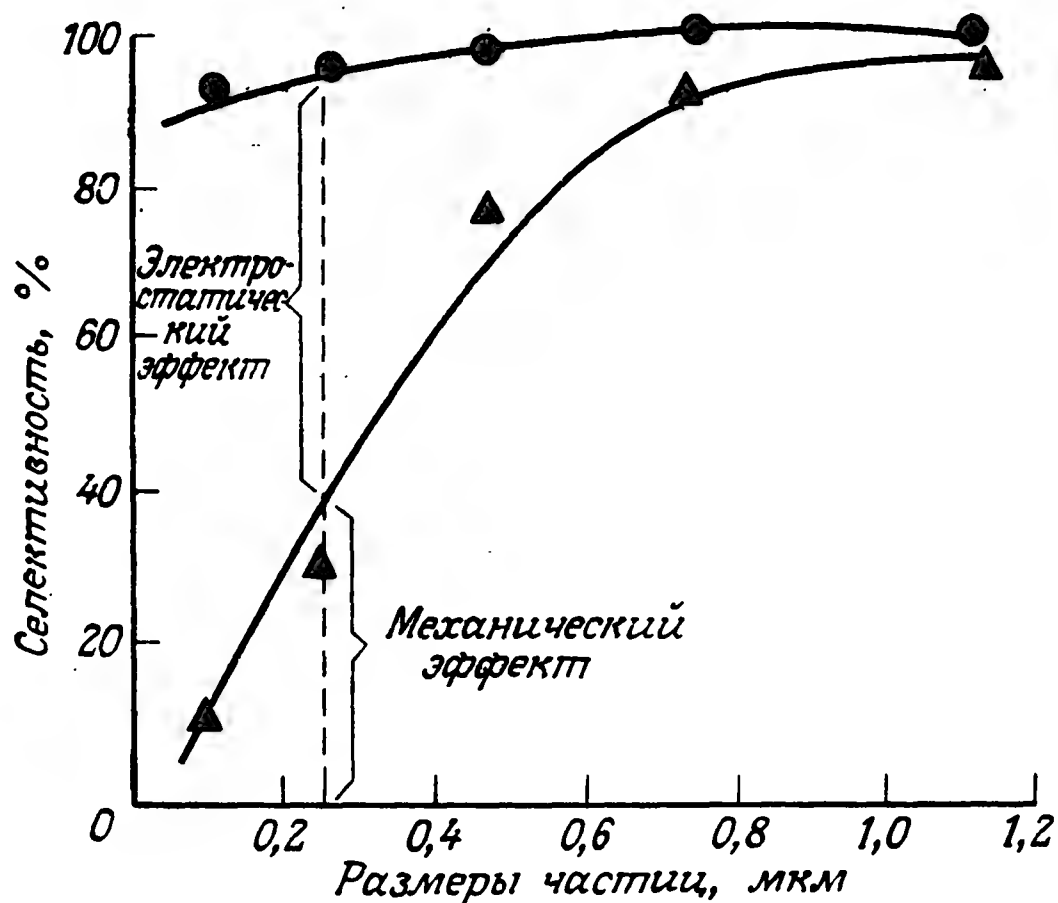


Рис. 2.8б. Иллюстрация важной роли силы электростатического взаимодействия при извлечении частиц. Частицы полистирольных латексов разных размеров пропускали через мембраны с положительно заряженной поверхностью и измеряли эффективность извлечения (кружки). С целью снятия положительного заряда мембраны фильтрацию осуществляли для растворов с рН в щелочной области; при этом извлечение частиц происходило лишь по механизму просеивания (треугольники). Разница между значениями ординат при соответствующих размерах частиц отражает влияние только электростатических сил. (Из работы [112].)

поэтому фильтры из него больше не применяют при работах с лекарственными препаратами и напитками. Другим примером положительно заряженного фильтра, но не выделяющего из себя волокон является Дзета-Плюс, выпускаемый фирмой «АМФ Кюно». Он синтезирован специально таким образом, что имеет положительный заряд в нейтральной области рН; особенно хорошо он подходит для извлечения вирусов из воды (см. разд. 12.5).

4. Отрицательный заряд мембраны можно снизить или даже снять его вовсе, повышая ионную силу фильтруемого раствора. Используя такой прием, при помощи мембран с номинальным размером пор порядка 5—10 мкм из воды можно извлекать частицы с размерами порядка размеров бактерий. Электростатическое притяжение между положительно заряженной мембраной и отрицательно заряженными частицами в особенности важно в случае частиц малого размера. Хоу и др. [112] определили относительный вклад механического фильтрования и электростатического притяжения при извлечении полистирольных латексов разных размеров; полученные этими авторами результаты приведены на рис. 2.86¹.

5. На задержку частиц мембранами оказывают влияние рН среды, ионная сила, расход фильтруемой жидкости и давление.

6. Использование мембран для ситования, т. е. для разделения двух или более видов частиц с разными размерами, представляет собой значительно более сложную задачу в сравнении с простым осветлением жидкостей или задержкой всех частиц. Большинство мембранных фильтров непригодно для использования их в качестве сит (см. разд. 11.5).

7. Крупные частицы, задержанные мембраной, могут сами выступать в качестве фильтра для задержки более мелких частиц. С ростом числа задержанных мембраной частиц этот эффект усиливается.

8. Фильтрация газов принципиально отличается от фильтрации жидкостей. В случае фильтрации газов частицы с размерами, много меньшими, чем номинальный размер пор мембраны, окажутся в большинстве своем задержанными [2]. Извлечение частиц происходит благодаря инерционному захвату, диффузии к поверхности мембраны и перехвату (см. об этом подробнее в гл. 14, в частности разд. 14.3). В случае фильтрации жидкостей в силу сравнительно высоких значений их вязкости такие факторы, как инерционные соударения и диффузия, играют незначительную роль, и действует лишь механизм перехвата.

¹ Этот рисунок хорошо демонстрирует влияние адсорбции фильтруемых веществ на селективность мембран.— *Прим. ред.*

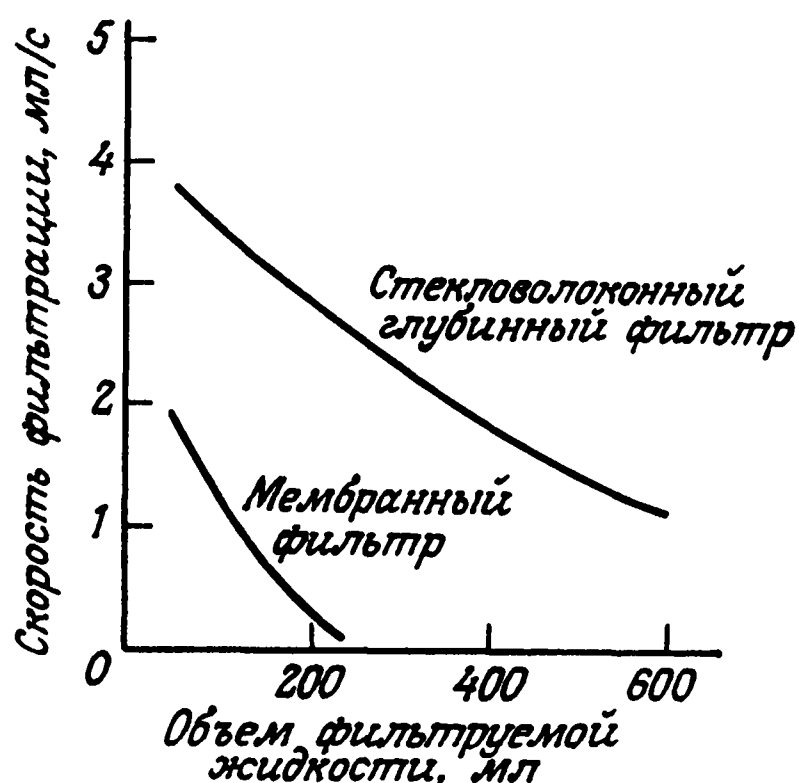


Рис. 2.9. Забивание мембраны и глубинного фильтра, иллюстрируемое падением производительности с увеличением объема фильтруемой жидкости. Глубинные фильтры забиваются медленнее мембран, поэтому через них можно пропустить значительно большие объемы жидкости.

9. Важно различать силы, которые *извлекают* частицу из жидкости, и силы, которые *удерживают* ее на мембране. Частица с размерами, меньшими, чем размеры пор, может быть извлечена из жидкости за счет адсорбции на поверхности пор мембраны, но если адсорбционные силы недостаточно велики, то частица может пройти сквозь мембрану и попасть в фильтрат.

10. Определенную роль для фильтрации играет так называемый **побочный поток**. Хотя поток жидкости направлен главным образом нормально поверхности мембраны, в глубине мембраны может иметь место также и поток в параллельном по поверхности направлении. Побочный поток определяется небольшими разностями скоростей потоков и краевых углов смачивания в соседних участках мембран. Этот поток больше всего проявляется в глубинных фильтрах, остается все еще значительным, хотя и в меньшей степени, в микропористых мембранах с сетчатой структурой и фактически отсутствует у трековых мембран.

Поскольку фильтрация суспензий осуществляется при постоянном давлении, удельная производительность мембраны постепенно падает, как показано на рис. 2.9. Это происходит вследствие ее забивания: большие частицы, задерживаемые мембраной, постепенно заполняют поры и блокируют их, в результате чего поток жидкости может вообще прекратиться. Скорость фильтрации определяется следующими факторами: 1) *перепадом давления на мембране*; фильтрация под давлением в общем случае протекает быстрее, чем под вакуумом, поскольку при этом возможно создать более высокий перепад давления; 2) *типом мембраны* и особенно размерами ее пор и пористостью; мелкие поры забиваются быстрее крупных; даже в случае отсутствия частиц в жидкости скорость ее потока

через мембрану с меньшими порами будет ниже, чем через мембрану с более крупными порами; 3) *площадью фильтрующей поверхности*; чем большая площадь поверхности приходится на единицу объема фильтруемой жидкости, тем медленнее забивается мембрана, поскольку в фильтрации участвует больше пор; 4) *вязкостью жидкости*; жидкости с более высокой вязкостью фильтруются медленнее; 5) *температурой жидкости*; при высоких температурах (главным образом за счет уменьшения вязкости) фильтрация протекает быстрее; 6) *наличием предварительного фильтра*; если мембранную фильтрацию осуществляют в целях осветления жидкости или ее стерилизации, то процесс можно существенно ускорить, если до мембраны использовать предварительный фильтр из какого-либо волокна, например из стекловолокна (см. гл. 7).

2.7. НЕКОТОРЫЕ НЕОЖИДАННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Из приведенного выше краткого обсуждения, по-видимому, ясно, что использование мембран не такое простое дело, как это может показаться на первый взгляд. Позже в этой книге мы подробно рассмотрим некоторые трудности процесса фильтрации, в настоящем же разделе мы лишь укажем на ряд проблем.

● Что вам требуется — мембрана или сито? Первая извлекает из жидкости все частицы, тогда как последнее применяют для фракционирования частиц по размерам. Ситование — гораздо более сложный в сравнении с фильтрацией процесс, и ни одна из имеющихся на рынке обычных мембран не может с достаточной эффективностью работать как сито. Для целей ситования лучше всех подходят трековые мембраны типа Нуклеопор (см. разд. 11.5).

● Частицы, во много раз меньшие, чем размеры пор, при некоторых условиях могут прилипать к мембране. На величину адгезии частиц оказывают влияние такие параметры суспензии, как ее рН и ионная сила, а также давление, при котором идет мембранная фильтрация, и скорость потока жидкости через мембрану. Определенное влияние оказывает также концентрация частиц; из концентрированных суспензий может прилипнуть к мембране больше частиц, чем из разбавленных. Кроме того, процесс может зависеть от объема фильтруемого материала; чем меньшие объемы жидкости фильтруются, тем сильнее проявляется явление адсорбции; в конце концов все адсорбционные центры оказываются занятыми, и при даль-

нейшей фильтрации частицы больше уже не будут адсорбироваться.

● Несмотря на то что процесс фильтрации через мембрану контролируется главным образом ее поверхностью, толстые мембраны оказываются более эффективными для извлечения частицы, чем тонкие. Это объясняется отчасти «глубинным» эффектом толстой мембраны (см. рис. 2.7) — частицы задерживаются поверхностными силами, действующими внутри извилистых пор.

● Напомним, что фильтрация — процесс, носящий статистический характер, и, если обработке подвергается достаточно концентрированная суспензия, отдельные частицы могут оказаться в фильтрате даже тогда, когда номинальный размер пор мембраны значительно меньше размеров частиц. Отчасти это происходит потому, что ни одна мембрана не является абсолютно совершенной: в них могут попадаться большие отверстия, которые по каким-то причинам остались незамеченными при качественном контроле. Даже если 99,999 % пор отвечают указанным в спецификации на мембраны данным, оставшихся 0,001 % пор может оказаться достаточным для неприятностей как при фильтрации концентрированных суспензий, так и в случае необходимости полного извлечения частиц, например при стерилизующей фильтрации. Подробнее эта проблема обсуждается в гл. 7.

● В литературе по мембранной фильтрации стало обычным делом говорить об **абсолютных мембранах**, когда речь идет о применении мембран для стерилизации. Однако, как мы показали выше, в действительности абсолютных мембран не существует (см. также [144]). Это обусловлено тем, что, во-первых, неизбежны дефекты в самой мембране и, во-вторых, некоторая доля частиц извлекается вследствие адсорбции, а на последнюю оказывают влияние параметры фильтруемой жидкости (рН, температура, ионная сила, химический состав, скорость потока жидкости через мембрану). Более подробно этот вопрос рассматривается в гл. 4 и 7.

● Напомним о том, что при фильтрации малых объемов часть раствора может оказаться удержанной мембраной. Это может быть нежелательным в случае, когда мембрана используется для осветления дорогостоящих жидкостей, например растворов радиоактивных соединений.

● Материал мембраны, как правило, химически неинертен, он может оказаться подверженным действию химических соединений, содержащихся в фильтруемой суспензии. Хотя фирмы-изготовители и сообщают данные по устойчивости предлагаемых ими мембран к различным растворителям (см. разд. 4.5), однако при фильтрации могут встретиться такие экзотические

растворители или их комбинации, устойчивость по отношению к которым не была еще проверена, так что тому, кто будет использовать в своей работе такого рода растворители, придется самому выполнить тщательные исследования мембраны на устойчивость к данному растворителю.

● Выше в настоящей главе мы упоминали о том, что поверхность мембраны может иметь отрицательный заряд. Матрица таких мембран может действовать как ионообменник и селективно адсорбировать катионы различных веществ. Подобную селективную адсорбцию следует учитывать при фильтрации небольших объемов жидкостей.

● За исключением трековых, не существует мембран со строго цилиндрическими порами. Матричная структура у традиционных мембран сетчатого типа нерегулярна, и ни одна из пор не может иметь постоянную форму по всей толщине мембраны. К сожалению, в каталогах некоторых фирм, выпускающих мембраны сетчатого типа, все еще содержатся указания на то, что их мембраны имеют цилиндрические поры.

Мембрана должна смачиваться той жидкостью, которая предназначена для фильтрации. Многие же из материалов мембран, в том числе наиболее широко распространенные эфиры целлюлозы, не смачиваются водой и должны быть обработаны смачивающими агентами, что является нежелательным, поскольку последние могут попадать из мембран в фильтрат.

2.8. СРАВНЕНИЕ ГЛУБИННЫХ И МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

В разд. 2.3 мы показали, что глубинные фильтры делают из волокнистых слоев, сформованных в виде мата или листа. Во многих случаях потребитель может использовать либо глубинный, либо мембранный фильтры. Как же решить, какой из них выбрать? При работе с глубинным фильтром фильтрация осуществляется внутри его матрицы, частицы задерживаются в щелях или адсорбируются на волокнах (рис. 2.10). Поэтому извлечение этих частиц и дальнейшее их исследование оказываются зачастую невозможными. Однако благодаря большой толщине глубинных фильтров в них может накопиться очень большое число частиц, прежде чем такой фильтр окажется забитым, поэтому по сравнению с мембранами пропускная способность глубинных фильтров гораздо больше. Глубинные фильтры имеют следующие недостатки:

1. С их помощью трудно извлекать частицы малых размеров (менее 1 мкм).



Рис. 2.10. Микрофотография, полученная на сканирующем электронном микроскопе, бактерий *Pseudomonas diminuta*, адсорбированных на волоконном глубинном фильтре. Длина масштабной метки слева внизу равна 1 мкм. (Неопубликованное фото с разрешения Т. Лихи, фирма «Миллипор корпорейшн».)

2. В фильтрате может оказаться некоторое количество отслоившихся волокон (так называемая «миграция среды»), что может быть весьма нежелательным (например, попадание волокон асбеста в инъекционные растворы, предназначенные для человека).

3. Может иметь место адсорбция растворенных компонентов (таких, как белки) из фильтруемой жидкости.

4. При длительном использовании одного фильтра (скажем, крупномасштабный процесс фильтрации проводится в течение 12—14 ч) задержанные матрицей микроорганизмы могут начать рост, давая потомство, которое постепенно проходя через фильтр, окажется в конце концов в фильтрате (это явление называется «проростом фильтра»). Именно с учетом этого явления законодательством США предписывается заменять фильтры, используемые для приготовления лекарственных препаратов, каждые 8 ч (см. гл. 7).

Важным отличительным признаком глубинного и мембранного фильтров является распределение пор по размерам.

В гл. 4 мы обсудим этот вопрос подробно, а здесь лишь заметим, что мембранные фильтры имеют разброс размеров пор в очень узком¹ интервале, тогда как у глубинных фильтров он значительно больше. Таким образом, можно всегда подобрать мембранный фильтр и быть в достаточной степени уверенным в том, что все частицы, размеры которых превышают указанные для мембраны средние размеры пор, окажутся извлеченными из фильтруемой жидкости. В случае же глубинного фильтра извлечение частиц носит главным образом статистический характер, поэтому вопрос о том, будут ли извлечены фильтруемые частицы данного размера, зависит от количества этих частиц в жидкости. При низкой концентрации этих частиц вероятность их прохождения через фильтр и попадания в фильтрат невысока. Напротив, если в фильтруемой жидкости их много, весьма вероятно проникновение некоторой их части в фильтрат. Таким образом, по задержке частиц мембранный фильтр ближе к «абсолютному», чем глубинный (с учетом сказанного в разд. 2.6).

2.9. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей главе мы описали в общих чертах процесс мембранной фильтрации. При использовании мембранных фильтров возможно осуществление таких процессов, как микрофильтрация и ультрафильтрация. Микрофильтрация предназначена для разделения суспензий, в то время как ультрафильтрация — для разделения растворов молекул, главным образом макромолекул. Два других процесса фильтрации — диализ и обратный осмос — позволяют выделять еще более мелкие частицы, на уровне единичных молекул и ионов. Предметом рассмотрения настоящей книги является главным образом микрофильтрация, хотя иногда мы будем обсуждать процессы ультрафильтрации и обратного осмоса, которые мы рассмотрим подробно в гл. 13. Диапазон размеров частиц, с которыми имеет дело микрофильтрация, весьма велик — от более чем 10 мкм до 0,1 мкм, т. е. порядка размеров вирусов. Микрофильтрацию осуществляют с применением трех типов пористых перегородок: глубинных фильтров, сделанных из переплетенных слоев микроволокон (из стекла, целлюлозы), традиционных сетчатых мембран, которые имеют открытую коллоидную структуру и изготавливаются из полимерных пленок, и трековых мембран (например, мембран Нуклепор), синтезируемых из плотных

¹ Так, отклонение размеров пор от средней величины, например у мембран типа ядерных фильтров, может достигать $\pm 2\%$. — *Прим. ред.*

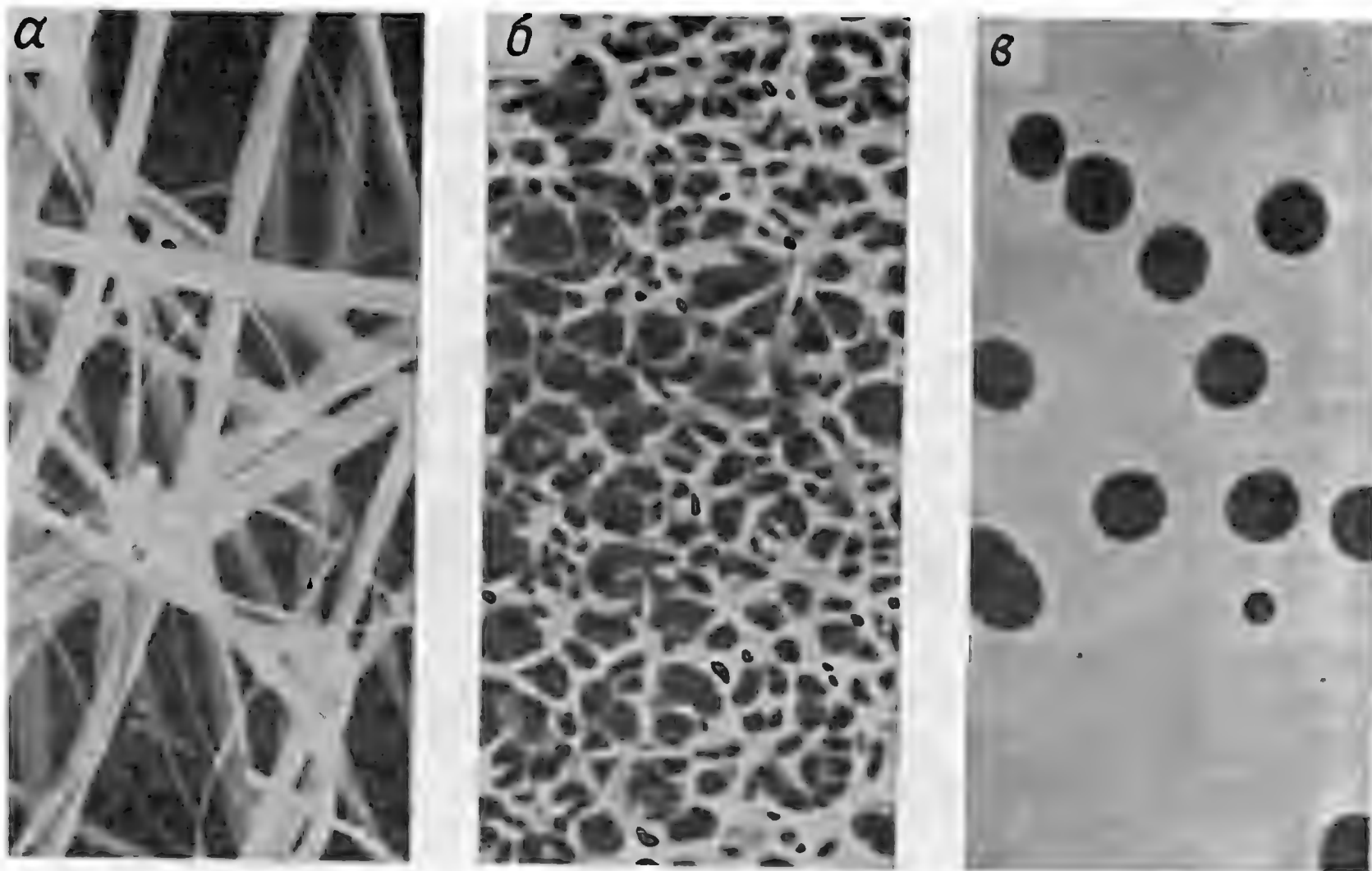


Рис. 2.11. Структуры различных пористых перегородок. *а* — глубинный фильтр; *б* — традиционная мембрана сетчатого типа; *в* — трековая мембрана Нуклепор.

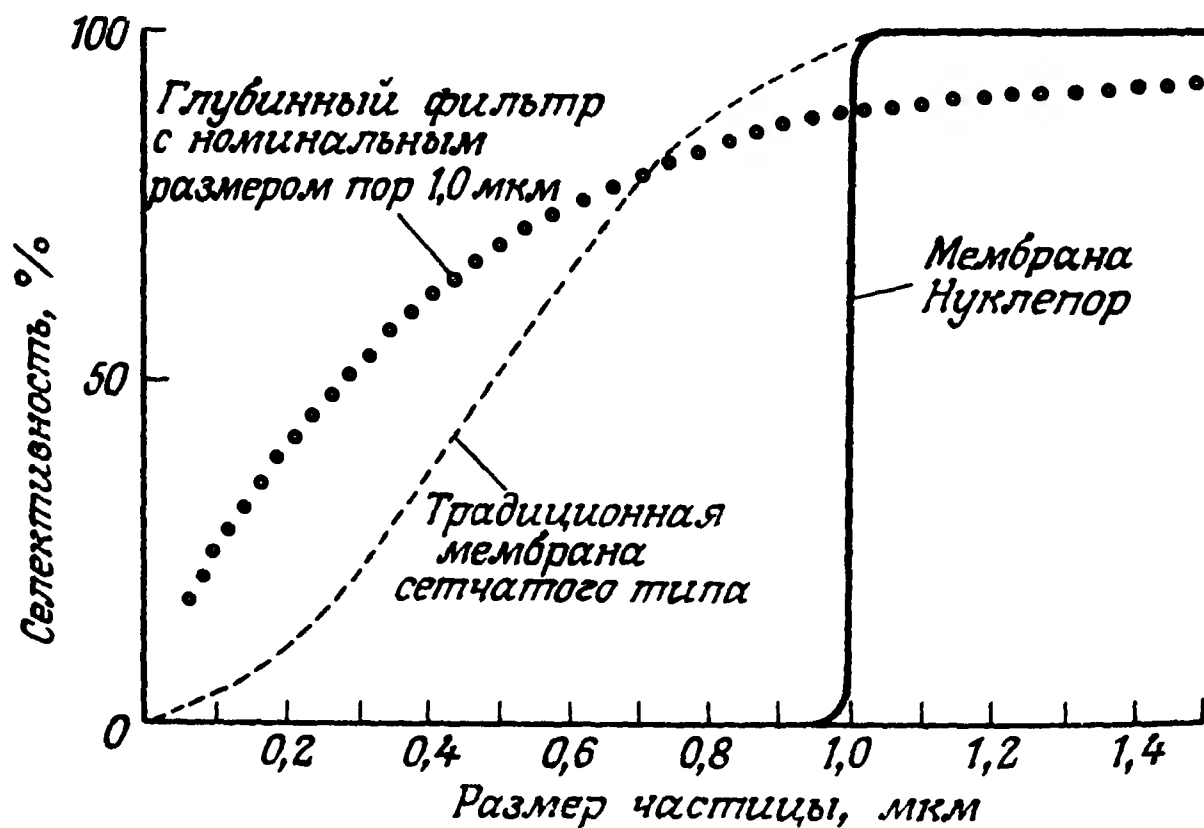


Рис. 2.12. Зависимость селективности пористых перегородок различного типа от размера фильтруемых частиц. Из кривых можно найти минимальные размеры частиц, полностью задерживаемых данной мембраной. (Номинальный размер пор для мембран автор не указывает; по-видимому, он составляет около 1 мкм. — Прим. ред.)

поликарбонатных пленок и имеющих, как правило, поры строго цилиндрической формы (рис. 2.11). Все три указанных типа пористых перегородок можно характеризовать распределением по размерам задерживаемых ими частиц. Как видно из рис. 2.12, лишь мембраны Нуклепор работают как сита.

Глубинные фильтры задерживают частицы в порах по всей своей толщине, в то время как мембраны — на своей поверхности. Первые из них обладают очень высокой удельной производительностью и достаточной устойчивостью к забиванию, вторые же имеют относительно низкую производительность и быстро забиваются. Если глубинные фильтры используют главным образом для осветления жидкостей, т. е. извлечения сравнительно больших частиц из суспензий, то мембраны применяют для извлечения мелких частиц. Хотя разброс размеров пор у мембранных фильтров значительно меньше, чем у глубинных, они не могут работать эффективно в качестве идеальных сит, поскольку нередко задерживают частицы гораздо меньших размеров, чем номинальные размеры пор.

Мембранные фильтры работают, не только механически задерживая частицы, но и адсорбируя их. Существенную роль играет также эффект капиллярности. Частицы могут удерживаться пористой матрицей и под влиянием электростатических и вандерваальсовых сил. Для того чтобы получать правильные результаты при использовании фильтрации в лабораторных исследованиях и в промышленности, необходимо тщательно изучить все тонкости самого процесса фильтрации.

Глава 3

Производство мембранных фильтров

3.1. ВВЕДЕНИЕ

Мембраны начали использовать в исследованиях более ста лет назад, когда в 1855 г. Фик для изучения явления диффузии применил полупроницаемые перегородки. В те времена их делали из кож животных, плавательных пузырей рыб и внутренних стенок кишок. Позже стали использовать твердые материалы, такие, как фарфор. Однако главный прогресс произошел, когда мембраны начали изготавливать из нитрата целлюлозы (нитроцеллюлозы). Сначала эти мембраны получались с порами неконтролируемых размеров, но в 1907 г. Бехгольд [23] разработал метод изготовления мембран калиброванной проницаемости, а позже этот метод был усовершенствован многими исследователями [57, 69, 115, 169].

Даже теперь многие мембраны изготавливаются из нитроцеллюлозы, но наряду с нею используются и другие эфиры целлюлозы, а также множество синтетических полимеров. Сейчас уже крайне маловероятно, чтобы кто-либо из нуждающихся в мембранах захотел сделать их кустарным способом; мембраны производятся большим числом фирм и продаются по вполне доступным ценам. Однако промышленная технология производства мембранных фильтров является собственностью фирмы (иными словами, она засекречена), поэтому потребитель, имеющий серьезные намерения, не в состоянии реально узнать ни точного состава материала, ни метода изготовления мембраны, необходимой для исследований или для проведения какого-либо процесса. Когда в научной работе имеешь дело с тем или иным предметом, важно составить себе некоторое представление о его природе, поэтому целью настоящей главы является изложение главных принципов, на которых основано производство мембранных фильтров. Наряду с этим мы опишем несколько конкретных способов их приготовления в лабораторных условиях в надежде на то, что все это поможет более четко представить реальный процесс производства мембран. Поскольку мембраны из нитрата и ацетата целлю-

лозы получили наибольшее распространение, главное внимание мы сосредоточим на изготовлении именно таких мембран. Мы обсудим также способ изготовления мембран облучением поликарбоната продуктами радиоактивного распада (мембраны типа Нуклепор) и получения их из акриловых полимеров, политетрафторэтилена (тефлона), нейлона и других синтетических полимеров.

Производство пористых фильтров и мембран может включать любую из широко применяемых в технике операций: спекание, отливка, растягивание, выщелачивание. **Метод спекания**, который является самым старым из них, заключается в сплавлении между собой твердых частиц керамики, стекла или серебра таким образом, чтобы они образовали твердую пленку или пластинку. Сплавление может быть осуществлено либо под давлением при высоких температурах, либо с применением связующих веществ под давлением при низких температурах. Поры материалов, полученных спеканием, представляют собой промежутки между спекшимися частицами. Пористость таких фильтров низка, поскольку большая часть объема фильтра занята самими твердыми частицами.

В методе отливки используют растекание тонкой пленки раствора, содержащего полимеры и последующее испарение растворителя, в результате чего образуется открытая коллоидная структура. Отливка является главной операцией при изготовлении обычных мембранных фильтров; более подробно мы рассмотрим этот метод в следующих разделах.

Метод растягивания состоит в том, что плотную полимерную пленку, например тефлоновую или полипропиленовую, аккуратно растягивают во всех направлениях при тщательно контролируемых условиях. При этом в пленке образуются поры, размерами которых можно управлять, размеры определяются способом растягивания. Все имеющиеся в продаже тефлоновые мембраны изготавливаются методом растягивания (см. разд. 3.8).

В методе выщелачивания пленку отливают из смеси двух веществ; когда пленка отлита, одно из веществ удаляют соответствующим растворителем, и при этом образуется пористая структура. В целях промышленного изготовления мембранных фильтров этот метод применяется редко.

Всю сложность изготовления мембранных фильтров и ту секретность, которая его сопровождает, можно представить себе из следующего диалога, приводимого в работе [117].

«Вопрос. Как вы делаете мембраны с заданными размерами пор и их распределением? *Ответ.* Могу по существу вопроса сказать, что их следует делать, имея в растворе некоторое количество смолы и высоковязкой жидкости, разливать смесь нужно с определенной скоростью при определенной темпера-

туре и дозированной скорости продувки воздуха над поверхностью разливаемой смеси. Я не волен разглашать тайну того способа, которым мы делаем мембраны, но могу сказать, что важное значение имеет тщательный контроль всех этих параметров, а также температуры смеси, температуры разливки и температуры поверхности, на которую производится разливка. Как вы поняли, это не очень-то простая процедура».

3.2. МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАН

Целлюлоза, будучи природным веществом, представляет собой полимер, состоящий из звеньев D-(+)-глюкозы, каждое из которых соединено гликозидной связью с атомом C-4 следующего звена (рис. 3.1). В природе она существует в виде

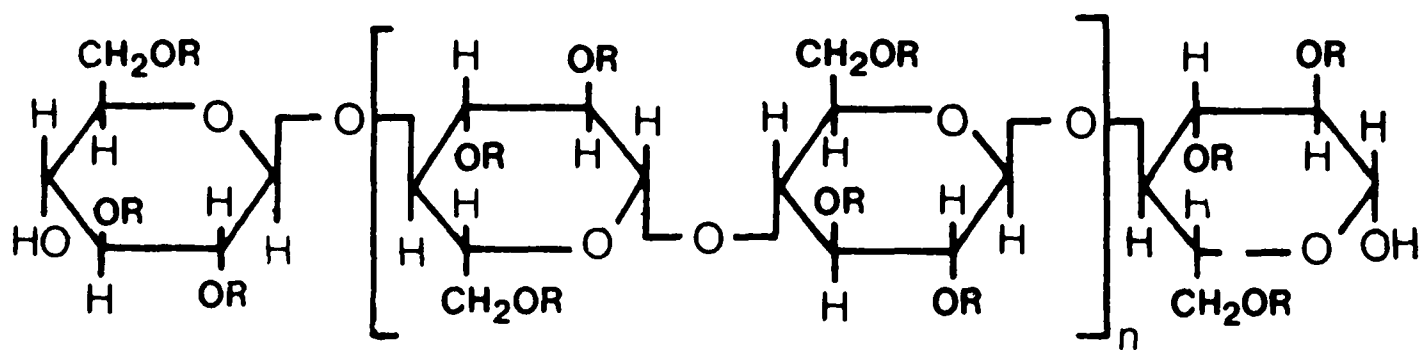


Рис. 3.1. Структурная формула целлюлозы и некоторых ее производных, из которых изготавливают мембранные фильтры. Дисахаридное звено, многократно повторяясь, образует длинный полимер целлюлозы. Производное определяется функциональной группой R. Не все группы R могут быть замещены. Если $R=H$, то соединение называется целлюлозой; если $R=NO_2$, — то нитроцеллюлозой, а в случае $R=$ ацетил мы имеем ацетилцеллюлозу.

смеси очень высокомолекулярных полимеров, упорядоченно связанных друг с другом, что обуславливает ее высокую кристалличность. Целлюлоза нерастворима в воде и в большинстве стандартных органических растворителей. Ее можно перевести в форму, растворимую в различных растворителях, если вместо свободных гидроксильных групп молекул сахаридов ввести органические или неорганические заместители.

Нитроцеллюлоза — это растворимое в некоторых растворителях производное целлюлозы, получающееся замещением множества гидроксильных групп нитрогруппами (см. рис. 3.1) в реакции между целлюлозой и азотной кислотой в присутствии серной кислоты в качестве катализатора. Нитроцеллюлозу, известную в промышленности под названием *пироксилин*, иногда называют также нитроклетчаткой, целлоидином или коллоидным хлопком. В сухом состоянии она взрывоопасна и легко воспламеняется. На протяжении многих лет полимерные пленки из нитрата целлюлозы использовали как основу для фото- и кинопленки, пока фирма «Истмэн Кодак» не разработала без-

опасную пленку на основе ацетилцеллюлозы. Нитрат целлюлозы поставляется промышленностью главным образом в виде 4 %-ного раствора в смеси, состоящей из одного объема этилового спирта и трех объемов эфира, под названием **коллодий** (фабричная марка фирмы «Дюпон», изготавливающей этот продукт,— *парлодий*). Многие годы нитроцеллюлозные мембраны для диализа делали в лабораторных условиях из коллодия [69], потом их вытеснили промышленные мембраны. Нитроцеллюлозу обычно характеризуют содержанием в ней азота, которое можно варьировать в больших пределах. Большинство промышленной продукции содержит около 11 % азота. (Можно заметить, что нитроцеллюлоза потребляется в промышленности для изготовления не мембран, а главным образом лаков и целлулоида, а также связующих и клеев.)

Ацетилцеллюлоза и эфиры целлюлозы на основе других органических кислот получают в результате реакции целлюлозы с подходящим ангидридом кислоты или хлорангидридом. Хотя таких эфиров можно получить достаточно много, промышленностью выпускаются главным образом ацетат целлюлозы (см. рис. 3.1), бутират целлюлозы и смешанные эфиры (ацетат и бутират). Хотя многие мембранные фильтры делаются из ацетилцеллюлозы, мы для простоты в настоящей главе будем рассматривать лишь мембраны из нитроцеллюлозы, поскольку принцип действия этих мембран такой же, как и у мембран из ацетилцеллюлозы.

3.3. ПРИНЦИПЫ МЕТОДА ОТЛИВКИ МЕМБРАН

Принципы, которые используются при изготовлении пористых мембран методом отливки, описаны Кестингом [125], Элфордом [69] и Даубнером и Петером [57]. Кестинг указывает на важное различие между полимерной непористой мембраной, часто называемой *полимерной пленкой*, и пористой мембраной. Непористая мембрана обладает высокой полимерной плотностью, значительной степенью кристалличности, и она имеет столь мало пустот, образующих поры, что сквозь нее плохо проникают даже газы. Поэтому она, как правило, не подходит для процессов фильтрации и сепарации.

Объем пустот **пористой мембраны** сравним или больше объема, занятого полимером, структура ее в основном коллоидная, или некристаллическая, и проницаемость для газов и жидкостей достаточно высока. Один из способов получения пористой мембраны заключается в том, что непористую мембрану помещают в некую среду, где ей дают набухать, при этом полимерная пленка подвергается структурным изменениям. Например, плотная нитроцеллюлозная пленка может стать порис-

той мембраной при набухании в 90 %-ном растворе этилового спирта в воде. Однако эта процедура крайне чувствительна к малейшим изменениям концентрации раствора и температуры, поэтому такой метод вызывает трудности при воспроизводстве пористых мембран.

Пористые мембраны для фильтрации обычно получают методом отливки в процессе, который Кестинг [125] назвал **фазоинверсным**. Этот процесс начинают с того, что полимер (например, нитрат целлюлозы) диспергируют в подходящем растворителе и получают таким образом коллоидную систему, называемую **золем**. Затем добавляют в смесь другое вещество, известное как порообразователь¹. Оно должно обладать высокой температурой кипения и не должно растворять полимер. Раствор вытягивают в тонкую пленку на стеклянной поверхности и дают растворителю испаряться при тщательно контролируемых условиях. В начальный период испарения растворителя концентрация порообразователя растет до тех пор, пока он не начнет оказывать влияние на растворимость полимера. В этой точке первоначально гомогенный золь превращается в гель (рис. 3.2), и в соответствующий момент времени полученную пленку переносят в закалочный раствор (обычно в воду) для того, чтобы извлечь оставшиеся порообразователь и растворитель; при этом гель, теперь уже — мембрана, стабилизируется. В другом методе растворителю и порообразователю дают возможность испариться из геля полностью в так называемом процессе *сухого формования*. Образовавшаяся при этом мембрана имеет коллоидную структуру с высокой степенью открытости. Поскольку как состав отливочного раствора, так и условия образования мембраны могут изменяться в широких пределах и мы можем управлять структурой геля, фазоинверсный процесс оказывается чрезвычайно гибким для производства полупроницаемых мембран.

На пористость и размер пор мембран влияет весьма сложный комплекс факторов. Именно полимер, из которого делают мембрану, должен обеспечивать превращение золя в гель, что ведет к инверсии фаз. Как правило, такие полимеры должны иметь очень высокую молекулярную массу. Нитроцеллюлоза представляет собой классический пример полимера, подходящего для изготовления мембран; другими материалами на основе целлюлозы являются ее ацетат и бутират. Можно использовать также множество иных синтетических полимеров, в том числе полиамиды (найлон), акриловые полимеры (на основе акриловой кислоты в качестве мономера — CH_2CHCOOH), поливинилхлориды (на основе винилхлорида — CH_2CHCl) и по-

¹ Порообразователь называют также нерастворителем.— *Прим. ред.*

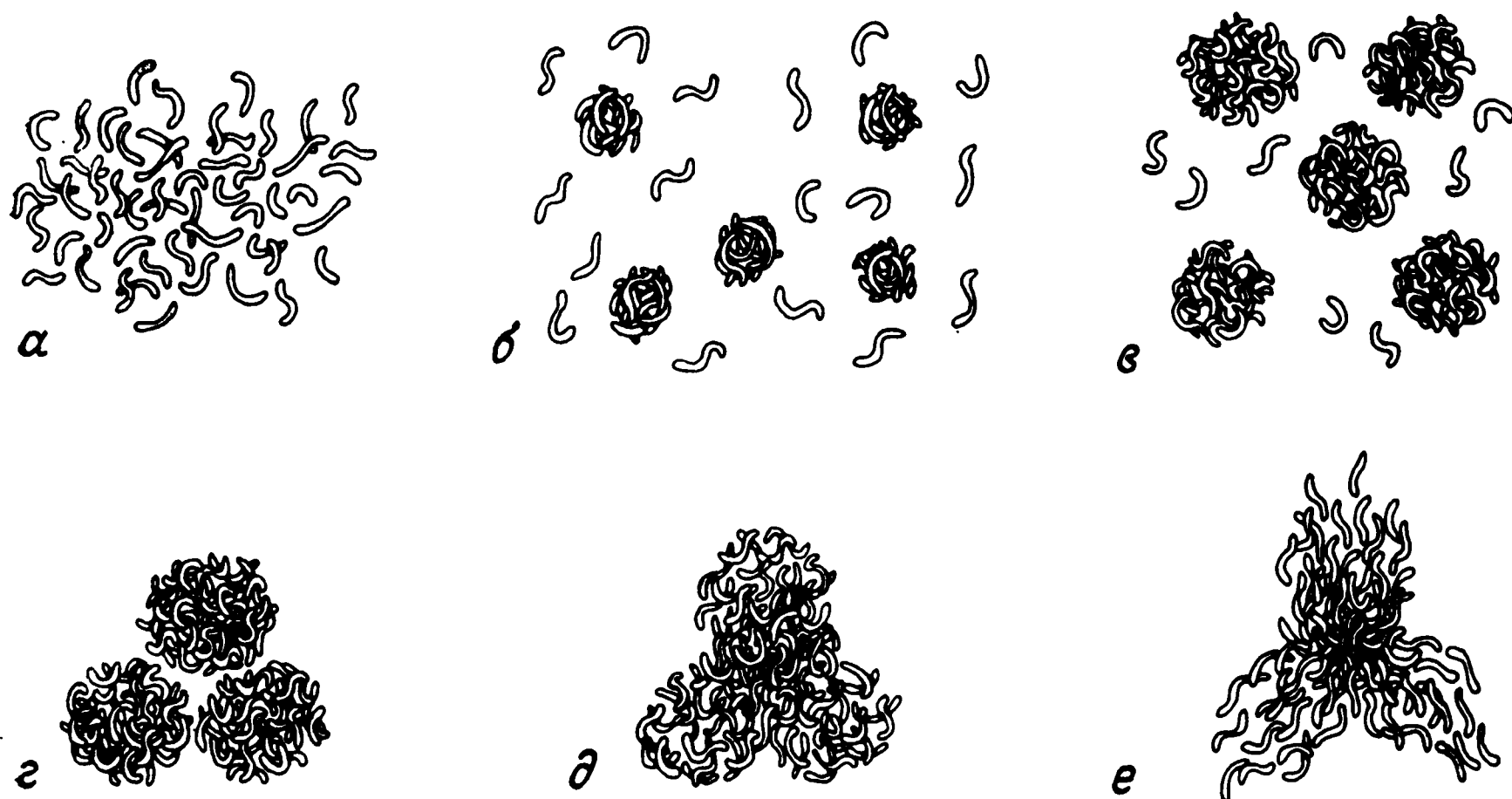


Рис. 3.2. Переход золь—гель при получении микропористой мембраны из первоначально гомогенного раствора нитроцеллюлозы. (По данным работы [125].)

лисульфоны (полимеры ароматических или алифатических производных с сульфоновой связью).

Для каждого из этих полимеров следует подбирать соответствующие растворители и порообразователи. Выбор растворителя и порообразователя зависит от полярности полимера. Слабополярные полимеры, такие, как эфиры целлюлозы, требуют слабополярных растворителей типа ацетона или диоксана; в то же время для некоторых более полярных полимеров требуются более полярные растворители, например метанол или этанол. Для неполярных полимеров требуются неполярные растворители типа эфиров. В любом случае используемый растворитель должен иметь низкую точку кипения, чтобы его можно было легко испарить в процессе отливки. Порообразователь же, с одной стороны, должен быть более полярным, чем растворитель, чтобы препятствовать растворимости полимера, а с другой стороны, его полярность не должна быть слишком высокой, иначе он может вызвать немедленное выпадение полимера в осадок. Как концентрация, так и полярность используемого порообразователя оказывают воздействие на окончательный результат операции отливки мембраны.

Кестинг [125] указывает на то, что идеальный отливочный раствор должен содержать очень сильный и летучий, быстро испаряющийся растворитель; это необходимо для того, чтобы инверсия фаз и гелеобразование протекали не слишком долго. В ходе испарения растворителя наступает момент, когда происходит спонтанное разделение,—капли одной жидкости ока-

зываются диспергированными в сплошной фазе другой. Если начальная концентрация нерастворителя высока, то разделение фаз будет происходить на ранней стадии еще до того, как может образоваться пленка, которая затем превратится в мембрану с большим объемом пустот. Если же концентрация нерастворителя вначале низка, то большая часть растворителя испарится прежде, чем образуются капли второй фазы, что приведет к возникновению капель, покрытых сравнительно толстым слоем полимера. В результате в переходном слое между плотной пленкой и пористой структурой наряду с закрытыми ячейками образуется пленка.

С началом образования геля пустоты, которые в будущей мембране станут порами, по мере испарения растворителя приводя к зарождению капель вокруг порообразователя. Глобулоподобные полости, образующиеся при желатинировании полимера, будучи вначале цельными и несоединенными друг с другом, при последующей сушке и сжатии могут войти в контакт между собой и изменить форму, превращаясь в полиэдры, стенки которых будут разрываться, что приведет к возникновению соединенных между собой пор с открытыми ячейками. Резкое торможение процесса образования мембраны, имеющее место, как правило, при перенесении зарождающейся мембраны в воду, не только приостанавливает процесс гелеобразования, но и способствует выделению из мембраны растворимых в воде компонентов.

Во многих случаях, когда мембрана предназначена для фильтрации водных растворов, в материал, из которого ее делают, вводят гидрофилизующие присадки. Это обусловлено тем, что многие полимеры, идущие на изготовление мембран, гидрофобны. Разумеется, воду через гидрофобную мембрану можно пропустить принудительно, используя достаточное давление, но величина этого давления оказывается столь высокой (10—20 атм), что мембрана может разрушиться, не будучи равномерно смоченной. Добавление гидрофилизующего агента позволяет осуществлять фильтрование и через сильно гидрофобную мембрану. Несмотря на то что гидрофилизующие агенты вымываются водными растворами (см. разд. 4.7, где обсуждается вопрос об экстрагируемых из мембран веществах), мембрана остается гидрофильной, пока сохраняется влага. Если ее высушить, она вновь становится гидрофобной. Примерами используемых гидрофилизующих агентов являются тритон X-100, Твин-80, Ключель-Ј, гидроксипропилцеллюлоза и глицерин.

Фторуглеродные мембраны, предлагаемые фирмой «Миллипор» под названием Дюрапор, представляют собой приготовленные отливкой мембраны, гидрофильные свойства кото-

рых обеспечиваются не гидрофилизующими добавками, а химическими модификациями фторуглерода. Как можно установить из рекламы фирмы «Миллипор», гидрофильность мембран Дюрапор достигается введением аминогрупп во фторуглеродный полимер. Фирма «Сарториус» поставляет на рынок целлюлозные мембранные фильтры Целласарт, сохраняющие гидрофильность даже при выведении гидрофилизующего агента. Размеры пор у таких мембран составляют 0,2—0,45 мкм, а их диаметр может меняться в широких пределах. Некоторые мембраны большого размера для облегчения обращения с ними имеют по паре специальных ушек.

Важный момент, на который следует обратить внимание относительно пористых мембран, изготавливаемых обычным фазоинверсным методом, о котором говорилось выше, заключается в том, что эти мембраны находятся в метастабильном состоянии в условиях, отличных от термодинамического равновесия. Если такую пористую мембрану подвергнуть воздействию высокого давления, термообработке или обработать растворителем, то она вернется в исходное состояние плотной пластичной пленки. Некоторые операции, часто проводимые при использовании мембранных фильтров, такие, как автоклавирование, фильтрация под давлением или фильтрация неводных жидкостей, при неаккуратном их выполнении могут приводить к разрушению коллоидной структуры мембраны с непредвиденными и нежелательными последствиями. Впечатляющую картину разрушения структуры мембраны можно наблюдать, поместив на предметный столик микроскопа обычную нитроцеллюлозную мембрану в атмосфере паров ацетона: белый непрозрачный материал внезапно превращается в плотную прозрачную пластичную пленку.

Хотя изготовление мембран методом отливки в небольших масштабах можно осуществлять с применением элементарного оборудования (см. следующий раздел), для получения воспроизводимых мембран в лабораторных условиях, и в особенности для исследования процесса их образования, необходимо специальное отливочное устройство. Пример такого устройства приведен на рис. 3.3. Отливочный раствор, медленно вытекая из бака, разравнивается плоским выравнивающим ножом с тщательно выполненным лезвием. Скорость движения бака над отливаемой поверхностью можно очень точно регулировать при помощи двигателя; кондиционирование сформированной мембраны происходит в климатических камерах. Преимуществом отливки мембран в таком устройстве является то, что условия процесса (скорость движения, высота подъема выравнивающего ножа, климатическая обработка) легко воспроизвести в промышленном масштабе.

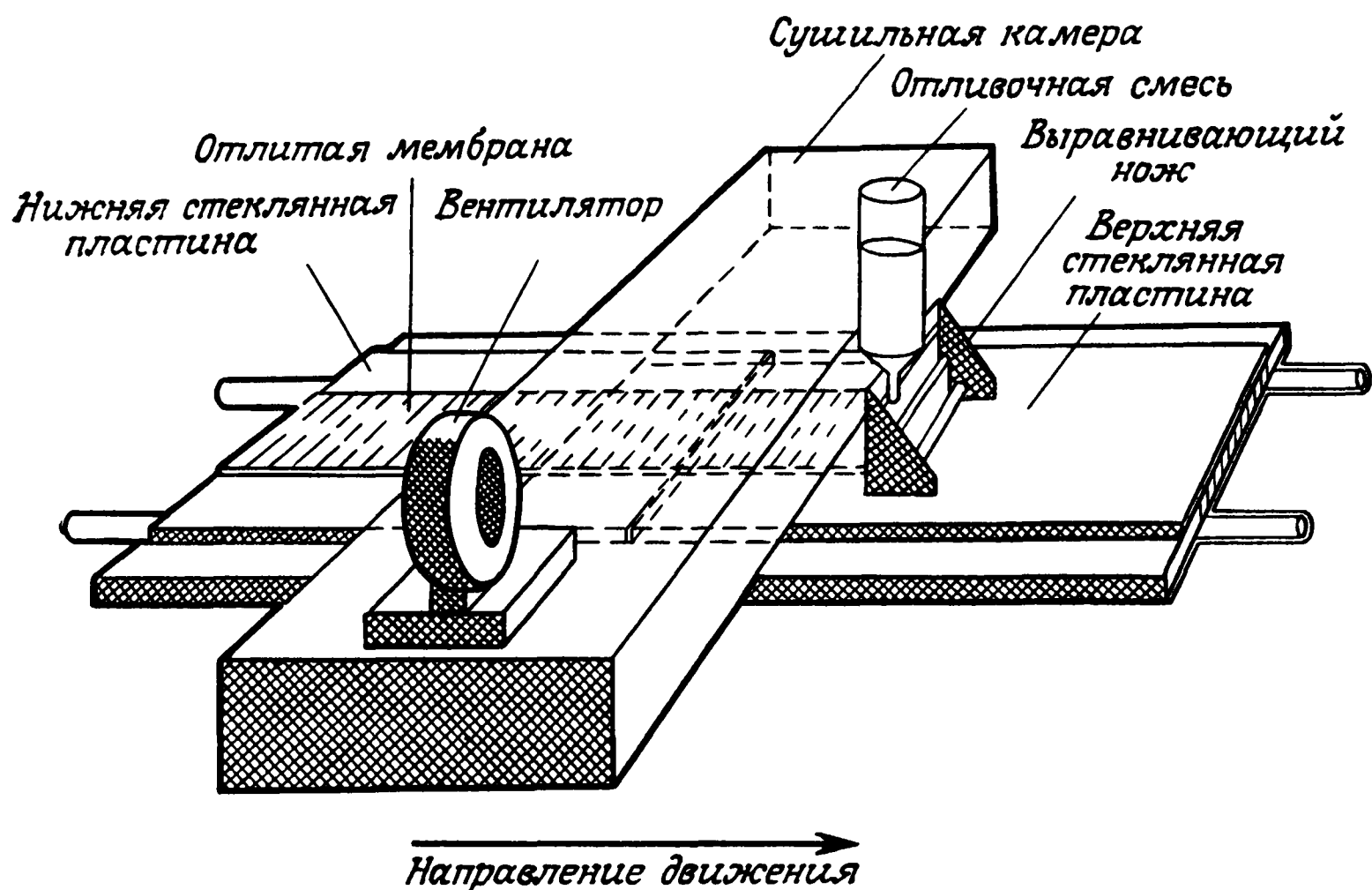


Рис. 3.3. Устройство для изготовления мембранного фильтра методом отливки в лабораторных условиях. Верхняя стеклянная пластина и отливочное устройство скользят по нижней стеклянной пластине со скоростью, которую можно регулировать с высокой степенью точности. (По данным работы [153].)

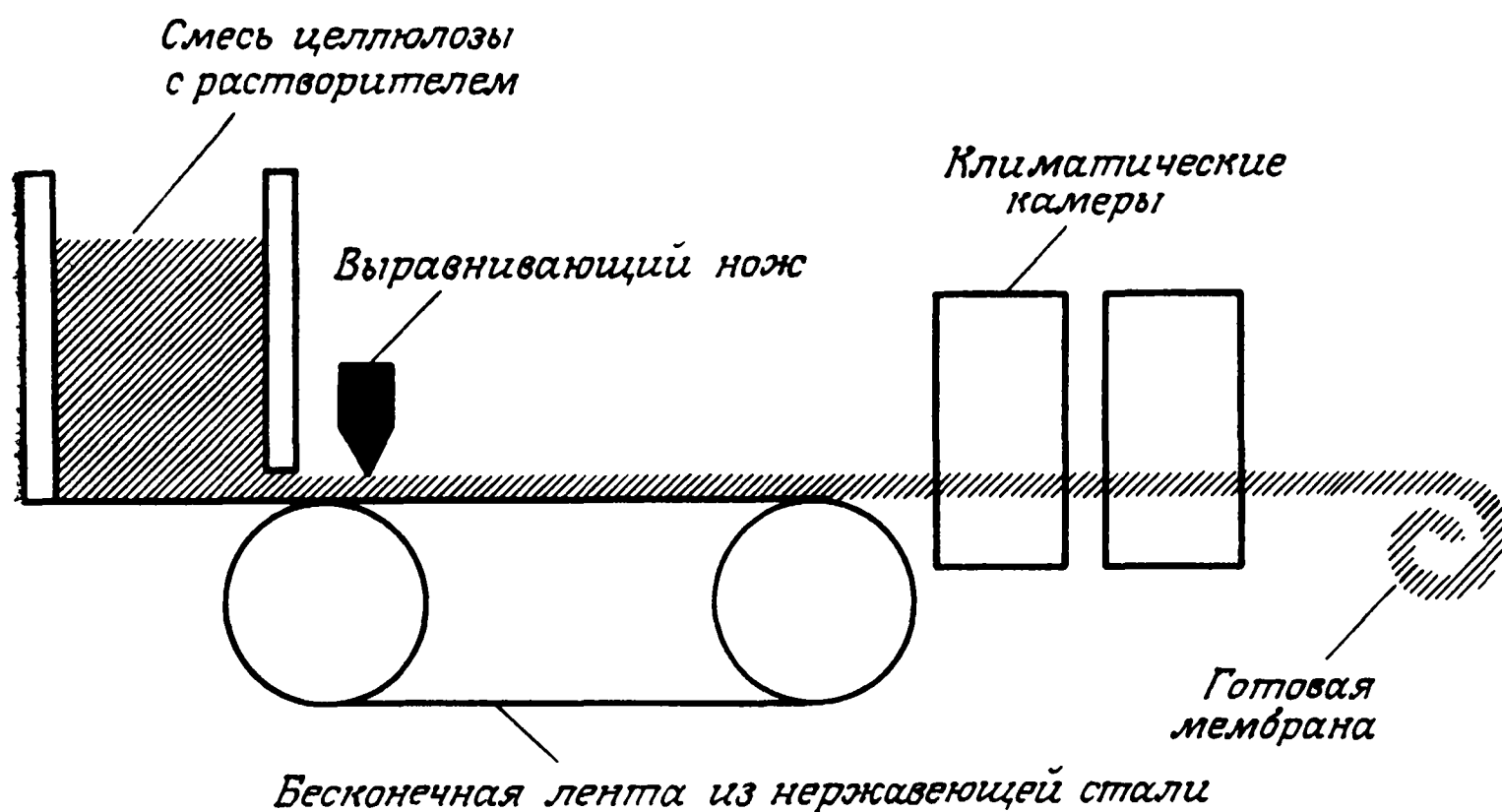


Рис. 3.4. Схема крупномасштабной промышленной установки для производства мембран. Отливочный раствор разливают на движущуюся ленту.

При крупномасштабном производстве мембранных фильтров для промышленных целей используют медленно движущуюся ленту, как правило, из нержавеющей стали (рис. 3.4). Фирма «Сарториус» производит мембранные фильтры в больших рулонах шириной 1,2 и длиной 40 м. По технологии этой фирмы одна загрузка бака идет на изготовление 8 рулонов общей длиной 320 м.

Более подробные данные о промышленном производстве мембран составляют собственность фирмы и не публикуются.

Изготовление пористых мембран фазоинверсным методом было достаточно хорошо отработано уже в 30-х гг. В 1937 г. Элфорд [69] описал методы получения широкого ряда полупроницаемых мембран, названных им «градокол». Благодаря электронной микроскопии и другим современным методам исследования искусственных мембран мы можем более ясно представить себе последовательность событий, происходящих во время перехода золя в гель, и, следовательно, можем получить значительно более широкий ряд необходимых мембран. В работе [186] приводится обзор современных промышленных способов производства мембран по данным патентной литературы.

Получение мембран для ультрафильтрации мы рассмотрим в гл. 13. Здесь следует заметить лишь то, что изготовить такие мембраны намного проще, чем микрофильтрационные. Нередко при неправильном ведении процесса изготовления мембраны для микрофильтрации образуется мембрана для ультрафильтрации.

3.4. ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ОТЛИВКИ МЕМБРАН

Даубнер и Петер [57] приводят несколько рецептов лабораторного изготовления мембранных фильтров для бактериологических исследований. Ниже мы кратко опишем процесс изготовления мембран, рассмотренный этими авторами.

Соответствующая смесь для отливки имеет следующие компоненты:

Нитроцеллюлоза (11 % азота)	150 г
Абсолютный этанол	250 г
Безводный эфир	750 г
Безводный ацетон	1150 г
Безводный амиловый спирт	575 мл

Следует подчеркнуть, что в течение всего процесса образования мембраны не должно быть воды, даже ее следов. Вначале гранулированную нитроцеллюлозу промывают дистиллированной водой, затем 95 %-ным этанолом и, наконец, абсолют-

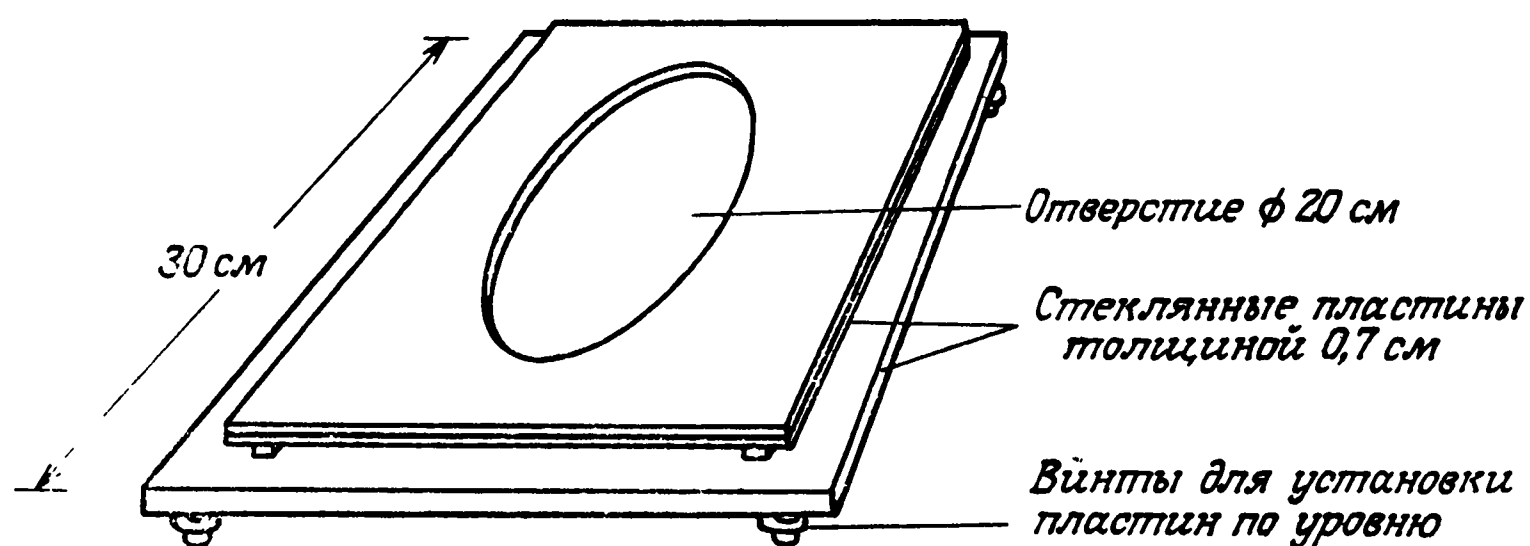


Рис. 3.5. Простое лабораторное устройство для получения мембранных фильтров методом отливки. (Согласно Даубнеру и Петеру [57].)

ным этанолом. Все используемые растворители должны быть тщательно обработаны для удаления следов воды. После промывки нитроцеллюлозу помещают в абсолютный спирт точно измеренного объема на 24 ч (при этом ее растворения не происходит). Для того чтобы вызвать растворение, добавляют эфир и смесь перемешивают до тех пор, пока полностью нитроцеллюлоза не растворится. Затем добавляют ацетон, смесь перемешивают в течение 2-х ч и после этого добавляют в нее амиловый спирт. По прошествии еще 2-х ч смесь готова к применению, причем в таком виде она может сохраняться 2—3 недели.

Аппарат для изготовления мембранного фильтра методом отливки представляет собой стеклянную пластину площадью 30×30 см и толщиной 0,7 см (рис. 3.5). Для того чтобы отливочный раствор растекался по стеклянной пластине равномерно, необходимо некое специальное устройство. Даубнер и Петер использовали устройство, впервые предложенное Элфордом и представляющее собой расположенное над основной стеклянной пластиной второе стекло с вырезанным в нем овальным отверстием; отливочный раствор подается через это отверстие. Весь аппарат размещается в боксе с тем, чтобы можно было контролировать внешние условия во время образования мембраны. Бокс следует располагать на специальном столе, тщательно выставленном по уровню.

На стеклянную пластину через овальное отверстие выливают 200 мл раствора нитроцеллюлозы. Температура регулируется в пределах $22\text{—}24^\circ\text{C}$, а относительная влажность — в пределах $55\text{—}60\%$. Растворитель испаряется в течение 75 мин. При этом стеклянная пластина с мембраной находится в воде. Затем мембрану осторожно разрезают на части заданного размера, отделяют от стеклянной основы и сохраняют во влажном состоянии либо в воде, либо в 30% -ном растворе этанола. Полученные таким способом мембраны имеют номинальный размер пор $0,40\text{—}0,45$ мкм.

3.5. СТРУКТУРА НИТРОЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МЕМБРАН

На размеры пор мембраны может оказывать влияние много различных факторов, из которых наиболее важную роль играет состав применяющихся растворителя и порообразователя. Даубнер и Петер [57] разделили растворители на несколько групп в соответствии с тем влиянием, какое они оказывают на образование геля:

1. Растворители, которые полностью растворяют нитроцеллюлозу. После завершения испарения растворителя образуется прозрачная пленка. К растворителям этой группы относятся амилацетат, эфир (в присутствии спирта), этилацетат, этилформиат, диоксан, уксусная кислота, метиловый спирт и метилпропионат.

2. Растворители, в которых нитроцеллюлоза набухает. Растворители этого типа растворяют нитроцеллюлозу значительно медленнее и вызывают ее набухание, прежде чем завершится растворение. Они очень чувствительны к влажности атмосферы. После растворения нитроцеллюлозы и испарения растворителя образуется белая опалесцирующая пленка. В эту группу растворителей входят ацетальдегид, бутанон, метилацетат и метилформиат.

3. Растворители, в которых нитроцеллюлоза образует гель. Эти растворители не растворяют нитроцеллюлозу, но вызывают ее набухание и образование геля при добавлении их к нитроцеллюлозе, находящейся уже в растворе. При смешивании с раствором нитроцеллюлозы больших количеств растворителей этой группы осадков не образуется. Присутствие одного из этих растворителей существенно для получения мембран. Примерами растворителей этой группы являются ацетон, этанол и пропанол.

4. Осаждающие агенты. При добавлении одного из этих веществ в раствор нитроцеллюлозы начинается интенсивное гелеобразование. К их числу относятся этиленгликоль, глицерин и вода.

Количество гелеобразующего растворителя в смеси определяет размеры пор образующейся мембраны после испарения растворителя. В качестве примера, иллюстрирующего влияние концентрации растворителя на размеры пор мембраны, мы приводим следующие данные, заимствованные из работы [57]:

Концентрация коллодия, %	Концентрация ацетона, %	Размер пор, мкм
100	0	0,03
90	10	0,06
85	15	0,14
80	20	0,35
75	25	0,84

Применявшийся коллодий содержал 4 % нитроцеллюлозы в смеси из одного объема этанола и трех объемов эфира.

По влиянию на размеры пор отдельные растворяющие компоненты смеси можно разделить на две следующие группы:

1. Растворители, которые увеличивают размеры пор получаемой мембраны: этилацетат, этанол с эфиром, этиленгликоль, амиловый спирт с ацетоном, глицерин, молочная кислота, вода.

2. Растворители, которые уменьшают размеры пор получаемой мембраны: этанол, амиловый спирт, уксусная кислота, метанол.

Согласно Джэкобсу [115] существенно влияет на размеры пор и прочность образующейся мембраны относительная влажность атмосферы, в которой испаряется растворитель. Если этот показатель лежит в пределах 35—55 %, то получаются мембраны удовлетворительного качества, но при влажности выше 60 % мембраны оказываются непрочными и хрупкими. Даже когда влажность находится в допустимых пределах, разница в диаметрах пор мембраны, полученной вырезанием краевой части листа, и мембраны из середины листа составляет 20—25 %. Это объясняется тем, что испарение растворителя вызывает конвекцию, которая приводит к опусканию окружающего воздуха в средней части листа, радиальному движению его к краям и поднятию на периферийных участках. Поэтому влага из воздуха абсорбируется раствором нитроцеллюлозы главным образом в центральной части образца. Но, поскольку в воде нитроцеллюлоза нерастворима, в этой части она агрегирует в большей степени. Разницу в размерах пор можно заметно снизить, если по периферии стеклянной пластины, на которой производится отливка, разместить металлические или картонные экраны. Эта мера направлена на снижение скорости испарения растворителя с периферийных участков.

Хотя здесь мы лишь поверхностно обрисовали процедуру лабораторного изготовления мембранных фильтров, по крайней мере основные особенности процесса должны быть ясными. Те, кто интересуется изготовлением специальных мембран для различных целей, могут обратиться к работе Даубнера и Петера [57], которая, по-видимому, является наиболее полезной. Эти авторы описывают конкретные методы изготовления прозрачных мембранных фильтров не на основе нитроцеллюлозы, а с использованием ацетилцеллюлозы для фильтрования органических растворителей, которые растворяют нитроцеллюлозу, а также прозрачных мембран из ацетилцеллюлозы, которые можно сохранять как влажными, так и сухими.

3.6. ТРЕКОВЫЕ МЕМБРАНЫ

Трековые мембраны представляют собой пористые перегородки, получаемые принципиально другим способом [75]. При прохождении продуктов радиоактивного распада сквозь твердое вещество в последнем образуются их следы (треки), которые после обработки соответствующими растворителями превращаются в узкие поры. Подобрав подходящую пленку, подвергнув ее облучению продуктами радиоактивного распада и выдержав в растворителе до тех пор, пока в ней не образуются сквозные отверстия, получают пористую мембрану (см. рис. 2.5). Трековые мембраны Нуклепор изготавливаются из поликарбонатной пленки толщиной 10 мкм (рис. 3.6). При этом для образования пор, перпендикулярных плоскости пленки, используют параллельные пучки высокоэнергетических частиц, как правило, осколков деления урана. Пористость трековых мембран зависит от времени облучения; однако она не должна быть слишком большой, иначе образующиеся поры из-за совпадения

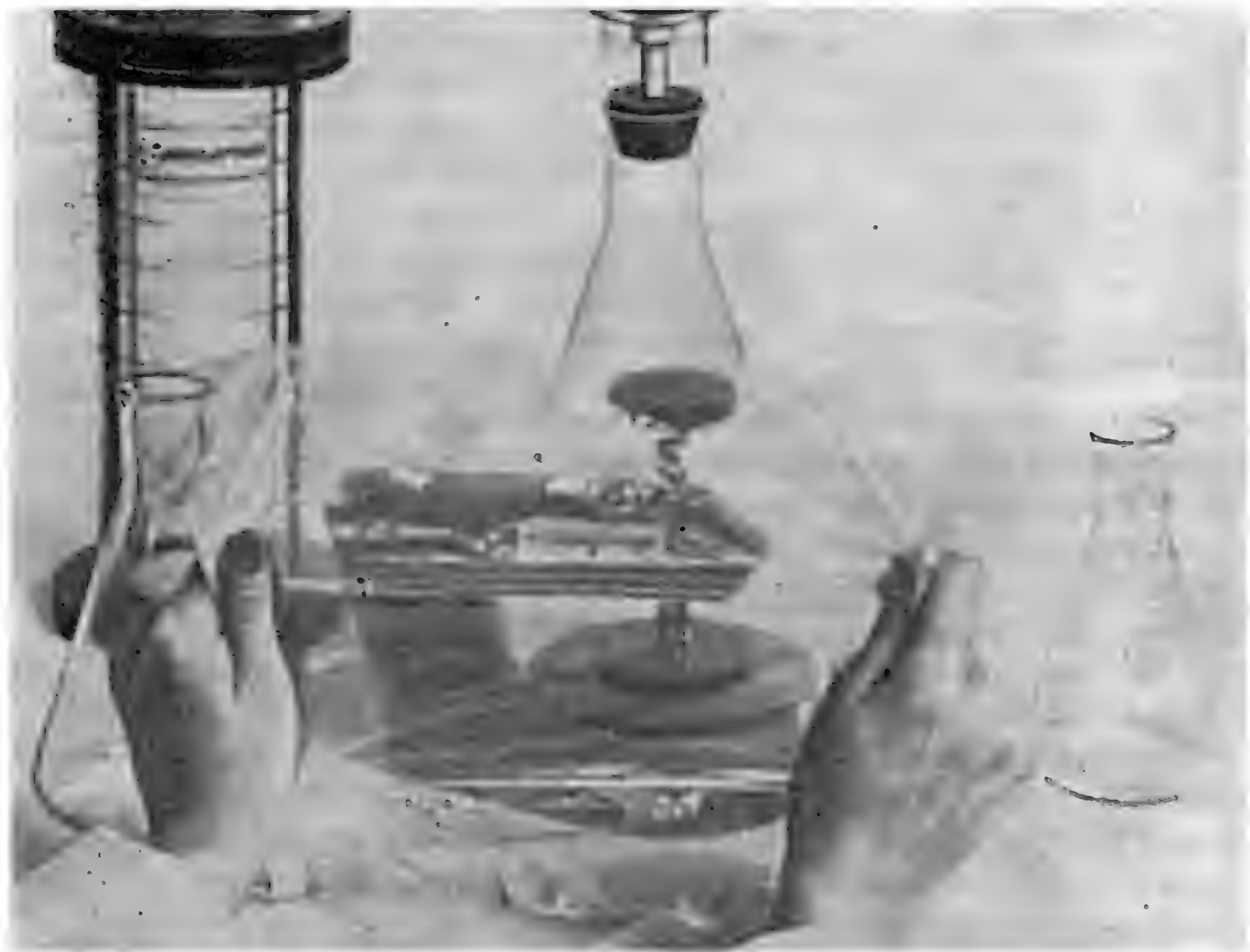


Рис. 3.6. Поликарбонатная пленка, используемая в производстве трековых мембран Нуклепор. (С любезного разрешения фирмы «Нуклепор корпорейшн».)

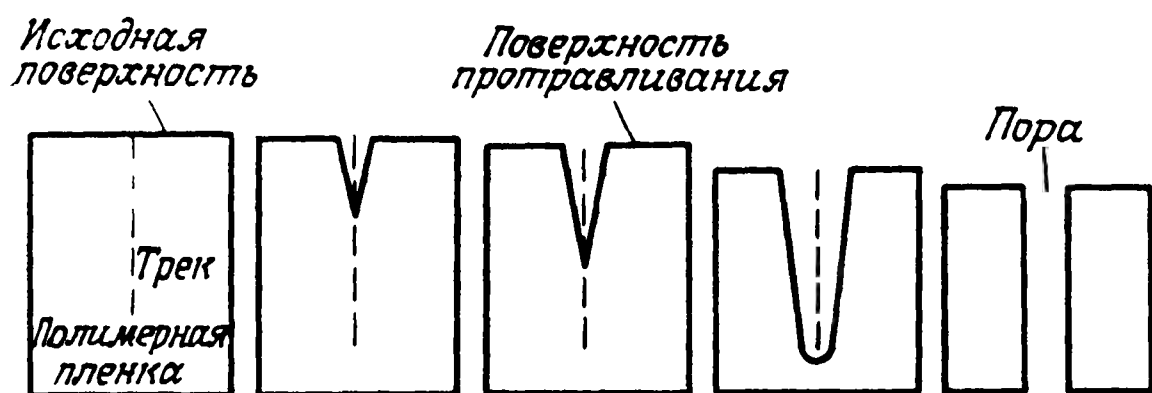


Рис. 3.7. Схема изготовления трековых мембран Нуклепор. Вдоль радиационных дефектов (треков) в пленке из поликарбоната образуется цилиндрическая пора вследствие протравливания пленки кислотой или щелочью. (Заимствовано с изменениями из работы [125].)

двух или нескольких треков будут перекрываться. Кроме того, мембрана становится менее прочной и с ней труднее обращаться. Для трековых мембран суммарная площадь сечения полученных пор составляет максимум несколько процентов общей площади пленки. Треки под действием протравливающих растворов превращаются в поры, как показано на рис. 3.7. Их размеры зависят от концентрации протравливающего раствора, времени и температуры травления. Самые маленькие по размерам поры образуются в том случае, если перед травлением пленку подвергают отжигу (это делает мембрану более устойчивой к травлению), а также при использовании более слабых протравливающих агентов.

Трековые мембраны близки к истинным ситам [95], и поэтому их применение особенно полезно, когда необходима калибровка микрочастиц по размерам. Однако они имеют ограничения. Вследствие очень небольшой их толщины (порядка 10 мкм) обращение с мембранами больших размеров затруднено. Кроме того, как видно из рис. 3.8, поры в таких мембранах могут перекрываться, поскольку на пленку осколки деления попадают случайным образом, причем с увеличением пористости такое перекрытие становится еще более значительным. Следует заметить также, что большинство пор, входные отверстия которых совпадают, пронизывают пленку насквозь под разными углами¹. В связи с этим такие перекрытия на поверхности поры лишь изредка сливаются вдоль всего фильтрующего канала, фактически образуя пору большего размера. Трековые мембраны, выпускаемые промышленностью, по своим свойствам близки к «абсолютным». Это единственные мембраны с истинно цилиндрическими порами, и при аккуратной эксплуатации с их

¹ Оси пор трековых мембран, выпускаемых фирмой «Нуклепор», наклонены к поверхности мембран под углами $\pm(0-34)^\circ$.— Прим. ред.



Рис. 3.8. Частично перекрывающиеся поры диаметром 1 мкм в мембране Нуклепор как результат случайного характера облучения пленки заряженными частицами. (С любезного разрешения фирмы «Нуклепор корпорейшн».)

помощью решаются многие проблемы ситования [194]; кроме того, они имеют большие преимущества для сканирующей электронной микроскопии.

3.7. СОСТАВНЫЕ МЕМБРАНЫ

Были разработаны различные типы составных мембран, у которых мембрана с заданной проницаемостью располагается на пористой механически прочной подложке. Преимущество таких составных мембран заключается в том, что сами мембраны с селективной проницаемостью не обязательно должны теперь обладать механической прочностью. Это значительно расширяет диапазон материалов, из которых могут быть сделаны мембраны, хотя в то же время и усложняет процесс их изготовления. Составные мембраны получают следующим образом. Сначала изготавливают мембрану с заданными свойствами, а затем помещают ее на прочную пористую подложку типа фарфора или фильтровальной бумаги; эти мембраны можно также приобрести в готовом виде у целого ряда фирм-изготовителей.

В настоящее время фирмы предлагают широкий ассортимент составных мембран. Так, фирма «Шляйхер и Шуль» поставляет нитроцеллюлозные мембраны на подложке из чистой

целлюлозы; такие мембраны лучше подходят для крупномасштабной фильтрации благодаря их повышенной механической прочности и более удобному обращению с ними. Фирма «Гелман» производит мембраны Версапор с селективным слоем из сополимеров акрила, изготовленным методом отливки и помещенным на нетканую нейлоновую основу. Мембраны Версапор обладают прекрасными фильтрующими свойствами и имеют предел прочности на разрыв свыше 200 атм.

3.8. НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ МЕМБРАН

Мембраны из тефлона (политетрафторэтилена) нашедшие широкое применение при очистке воздуха и фильтрации неводных растворов, изготавливают методом **контролируемого вытягивания** плотных тефлоновых пленок. Этот процесс запатентован У. Л. Гором с компаньонами (г. Элктон, шт. Мэриленд, США), которые продают мембраны под названием Гортекс в виде больших листов. Производители мембран покупают эти большие листы, нарезают из них фильтры различных размеров и упаковывают их. Размеры пор поставляемого материала для мембранных фильтров равны 0,02; 0,2; 0,45, 1,0; 3,0; 5,0 и 10—15 мкм. Структура мембраны Гортекс сильно отличается от структуры обычных мембран из эфиров целлюлозы, что видно из рис. 3.9. Выпускаются как мембраны без подложки, так и составные мембраны из большого числа слоев. Слоистые мембраны характеризуются более равномерным распределением пор по размерам и значительно большим удобством в работе. Слои-подложки могут быть из полиэтиленовых тканей или сеток, полипропиленовых тканых и нетканых структур, полиэфирных нетканых структур, пенополиуретана. Большинство фирм-производителей продает мембранные фильтры Гортекс, имеющие их собственные торговые наименования.

Фирма-производитель	Обозначение	Подложка
«Гелман»	TF, Тефлон	Полипропиленовое полотно
«Миллипор»	Флюоропор	Полиэтиленовая сетка
«Шляйхер и Шуль»	TE	Полипропилен нетканый
«Сарториус»	PTFE	Без подложки
«Микрофилтрейшн Системс»	Тефлон	Полипропиленовое полотно
«Ватман»	WTP	Полипропиленовое нетканое полотно

Следует заметить, что фторуглеродный мембранный фильтр, поставляемый на рынок фирмой «Миллипор» под названием Дюрапор, изготавливается не вытягиванием, а методом отливки по технологии собственной разработки.

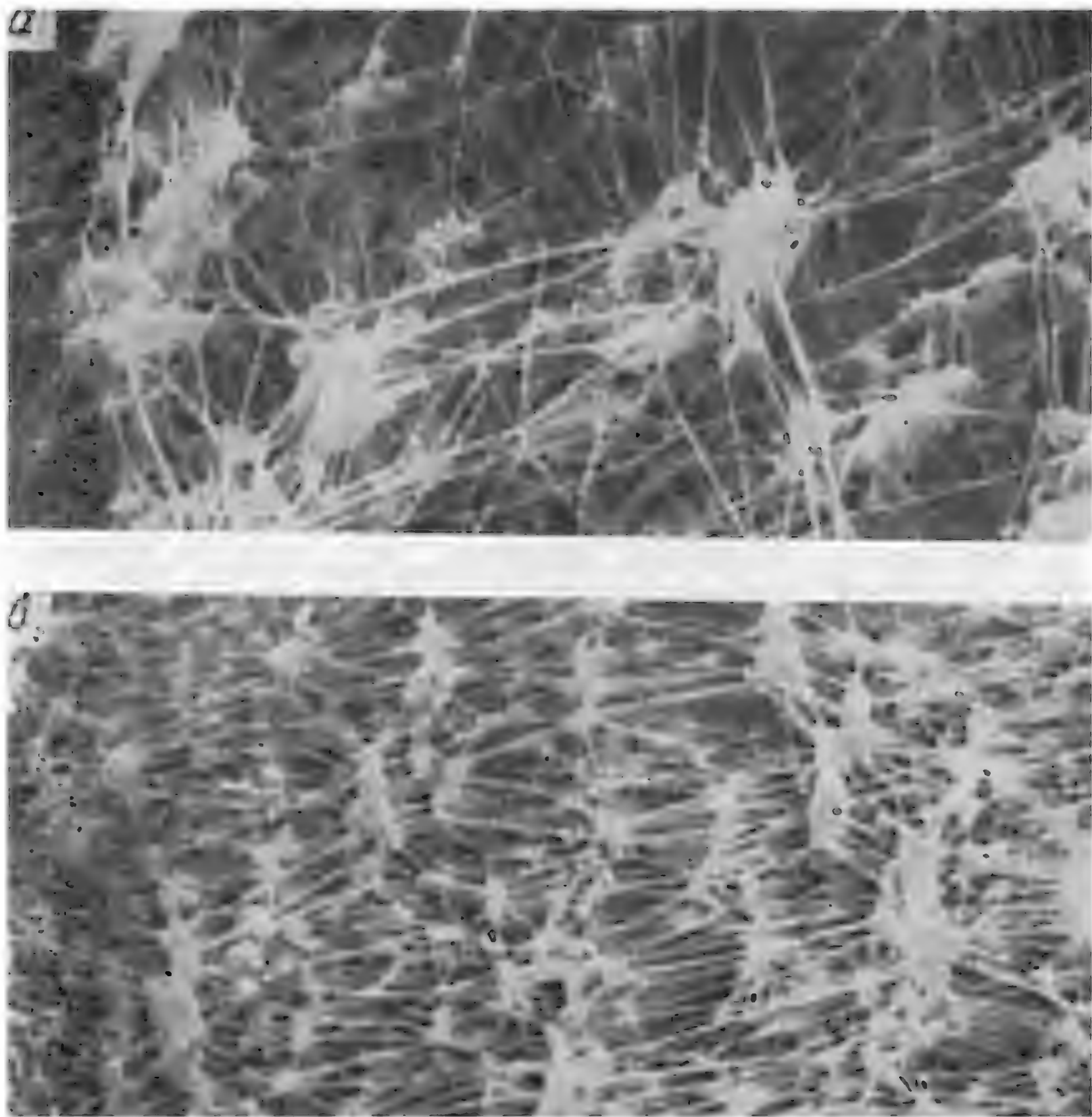


Рис. 3.9. Мембраны из тефлона фирмы «Гортекс», изготовленные методом контролируемого вытягивания: *а* — размер пор 0,5 мкм; *б* — размер пор 0,45 мкм. Масштаб увеличен в 2300 раз. (С разрешения У. Л. Гора и компаньонов.)

Еще один подход к решению проблемы мембранной фильтрации заключается в производстве **мембран из полого волокна**. Они применяются главным образом при ультрафильтрации и в обратноосмотическом процессе (см. гл. 13) и находят все более широкое применение в промышленности. Полые волокна делаются методом продавливания, схожим с тем, который используют в производстве синтетических волокон в текстильной промышленности. Полое волокно образуется при продавливании полимерсодержащей жидкости (как правило, горячей) через насадку определенной формы (*спиннерет*) в среду, где появляющаяся нить быстро стабилизируется. Стабилизация протекает на

коротком участке пути от насадки и состоит в том, что происходит резкое изменение вязкости полимера и достигается необходимая проницаемость. Для окончательной обработки перед сборкой в пучки стабилизированные волокна пропускаются с напряжением под валками по направляющим приспособлениям. Насадка для продавливания представляет собой не просто полую трубку — это повлекло бы за собой получение сплошного волокна вместо полого, — а составную, так что образуется полый кольцевой канал, через который и продавливается жидкость. Иногда внутри одной насадки помещают другую таким образом, чтобы создать центральный канал, через который проталкивается жидкость и газ. Пример полого волокна рассмотрен в разд. 13.6.

Полученный таким образом пучок волокон необходимо уплотнить внутри оконцовки (фланца). Эта операция называется **герметизацией**. В качестве герметика используются смолы с определенными свойствами, на которые не должны влиять условия эксплуатации полых волокон. Обычно герметизация осуществляется следующим образом. Пучок волокон сгибают в петлю так, что оба конца волокон оказываются рядом, после чего концы пучка герметизируются во фланце. Затем пучок вставляется в патрон: при этом открытые концы волокон оказываются снаружи патрона. При использовании такого патрона для фильтрации жидкость входит через его боковое отверстие и обтекает наружную поверхность волокон, а фильтрат попадает внутрь каждого волокна и выходит через его открытый конец, загерметизированный во фланце (более подробное описание этих фильтров см. в гл. 13).

Полые волокна можно делать из различных термопластических материалов, в том числе из полиолефинов, полиамидов, поливинилхлорида, полистирола, поликарбонатов и полиакрилов. Мембраны для ультрафильтрации на основе полых волокон производства фирм «Амикон» и «Нуклепор» (см. разд. 13.6) изготавливают из полиамидов. В работе [163] дается краткое рассмотрение полезных вопросов производства полых волокон, а в работе [187] приводится множество технических подробностей, почерпнутых из патентной литературы.

Один из наиболее интересных подходов к проблеме получения мембран с действительно ситовыми свойствами является создание **пучка стеклянных капилляров**. Идея состоит в том, что большое число стеклянных капилляров аккуратно располагают в виде тонкого слоя, в котором образуются параллельные друг другу поры перпендикулярно плоскости листа. Изготавливать этим способом мембраны с размером пор того же порядка, что у обычных мембранных фильтров, трудно, а стоимость их значительно выше, но для некоторых специальных целей они

могут подходить идеально (ими располагает фирма «Галилео Электро Оптикс»). Такие пучки можно также набирать из полых волокон, сделанных на основе органических полимеров [125], хотя промышленностью их выпуск, по-видимому, еще не освоен.

Биро и Мерка [27] описали процесс изготовления **мембранных фильтров из альгината алюминия**. Эти мембраны обладают уникальной способностью становиться водорастворимыми в результате специальной обработки. После фильтрации через них водных суспензий на мембране остаются твердые частицы, которые можно затем извлечь путем перевода их в водную систему. Альгинаты представляют собой соли альгиновой кислоты — полисахарида, выделяемого из морских водорослей. Сама альгиновая кислота и ее алюминиевая соль нерастворимы в воде, тогда как натриевая соль в воде растворима. Из альгината алюминия, приготовленного в виде плоского листа, можно получить мембрану с необходимыми фильтрующими свойствами. С целью увеличения механической прочности такую мембрану помещают на поверхность бумажного фильтра, т. е. эта мембрана является составной.

Чтобы получить мембрану из альгината алюминия, фильтровальную бумагу, вырезанную в форме круга, пропитывают раствором хлористого алюминия одномолярной концентрации. Затем на этот фильтр наносят однопроцентный раствор альгината натрия и тщательно разглаживают массу алюминиевым бруском, так чтобы слой получился тонким и равномерным. В течение первых тридцати секунд начинается, а к девяностой секунде завершается образование желеобразной мембраны. Примерно через полчаса бумажный фильтр с мембраной помещают в дистиллированную воду. Мембрану нужно сохранять влажной, стерилизовать ее можно автоклавированием, причем стерильные мембраны могут сохраняться на протяжении нескольких недель. Долговечность мембраны можно увеличить, если перед пропиткой бумажного фильтра к раствору альгината натрия добавить 1 % глицерина, а полученную мембрану высушить.

Мембраны из альгината алюминия, полученные указанным способом, можно использовать в стандартных аппаратах для фильтрации, а водные системы можно пропускать через них обычным путем под вакуумом. После фильтрации мембрану отделяют от бумажной основы и помещают в стерильный 3,8 % - ный раствор цитрата натрия¹. В течение 1—2 мин мембрана растворяется в этом растворе без остатка. Применяя такую процедуру, можно из очень разбавленных водных суспензий получать суспензии с высоким содержанием частиц. Мембрану можно

¹ Натриевой соли лимонной кислоты.— *Прим. перев.*

также применять для концентрирования микроорганизмов или для подсчета жизнеспособных микроорганизмов при анализе загрязнений воды. Из изложенного выше видно, что изготовление мембран из альгината алюминия несложно, а их уникальные свойства могут сделать их привлекательными для некоторых исследовательских целей.

Еще один метод состоит в изготовлении **фильтров из спекаемых частиц**. Спекание — это обработка большого числа частиц высокими температурами, при этом происходит сплавление частиц друг с другом, а пространство между ними образует поры, размеры которых определяются глубиной сплавления. Один из первых бактериологических стерилизационных фильтров был сделан из сплавленного фарфора. Среди других материалов для фильтров, получаемых спеканием, являются стекло и серебро. Такие фильтры имеют небольшую пористость и, следовательно, низкую скорость фильтрации через них. Поэтому эти фильтры применяются в настоящее время главным образом в тех случаях, когда коррозионность среды не позволяет использовать обычные мембранные фильтры (см., например, разд. 14.5).

3.9. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ

Для того чтобы мембраны сделать более пригодными для тех или иных экспериментальных задач, их можно модифицировать в ходе изготовления или после этого, не изменяя их проницаемости. Например, чтобы облегчить определенные методы анализа частиц, для окраски мембран используют вместо белого красителя черного или зеленого цвета. В другом случае, чтобы предотвратить подтекание жидкости по краям в те части фильтродержателя, к которым сам процесс фильтрации отношения не имеет, периферийную часть мембраны делают гидрофобной. Такие мембраны используют, например, при определении стерильности антибиотика и антисептических растворов; токсичное вещество, будучи ингибитором, не адсорбируется на периферии фильтрующей поверхности и не переносится в сосуд с культурой (см. разд. 7.7). Еще в одном частном случае на поверхность мембраны наносится гидрофобное вещество в виде сетки, так что квадраты этой сетки образуют независимые области для проведения соответствующих микробиологических анализов (см. разд. 9.7). Менее сложно и более полезно наносить сетку краской — это облегчает подсчет колоний на поверхности мембраны. Эти специальные типы применяемых в промышленности мембранных фильтров подробнее рассматриваются в следующих главах.

Абсолютно устойчивую к действию растворителя мембрану

можно получить, если удалить ацетильные группы из ацетилцеллюлозы уже готовой мембраны. В результате образуется **мембрана из регенерированной целлюлозы**. Деацетилирования можно добиться обработкой ацетилцеллюлозной мембраны щелочью. Пористая структура и физические характеристики этих мембран почти идентичны свойствам мембран из ацетилцеллюлозы, из которых они получены [80].

Наряду с тем что мембраны используют как плоские фильтры, из них можно изготавливать патроны для крупномасштабного промышленного применения. Так называемые фильтр-патроны делают обматыванием мембраны вокруг центрального стержня с последующим надеванием на нее внешней трубки из твердой пластмассы. Концы мембраны герметизируют соответствующим клеем в верхней и нижней частях патрона, так что получается единая система, в которой вся жидкость, вошедшая в патрон, должна пройти через мембранный фильтр, прежде чем покинет его. Конструкция фильтр-патрона и фильтрация через него подробно рассматриваются в гл. 6 и 7.

3.10. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая глава была посвящена главным образом рассмотрению методов изготовления целлюлозных мембранных фильтров заданной пористости. Наиболее широко применяемыми материалами для мембран являются нитро- и ацетилцеллюлоза. Эти вещества образуют коллоидные растворы (золи) в определенных растворителях или в их смесях. Если такой золь разлить тонкой пленкой на стеклянную пластинку и подвергнуть регулируемому частичному испарению, начнется процесс желатинирования, ведущий к получению открытой мембранной структуры коллоидного типа. Большое разнообразие смесей растворителей и варьирование в широких пределах условий желатинирования позволяют получать мембраны с пористостью¹ в очень широких пределах. Хотя принципы образования мембран с определенными размерами пор достаточно хорошо известны, очевидно также, что в производстве мембран важную роль играет эмпирический подход.

Лабораторные методы изготовления мембранных фильтров для бактериологических исследований хорошо известны, однако мы не рекомендуем получать мембраны своими силами, поскольку это весьма дорогое удовольствие. Фирмы-производители имеют значительно лучшие условия для изготовления мембран с постоянными характеристиками и с относительно невысокой стоимостью.

¹ Здесь, по-видимому, речь идет не только о количестве пор, но и о средних значениях их размеров.— *Прим. ред.*

Глава 4

Характеристики и стандартизация мембранных фильтров

4.1. ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей главе мы познакомили читателя с некоторыми методами изготовления мембранных фильтров и показали, что тщательным подбором условий отливки можно получить мембраны с размерами пор, изменяющимися в широких пределах.

Цель настоящей главы — изложить методы определения физических свойств мембранных фильтров и показать, как выбрать подходящую мембрану для применения в тех или иных целях. Кроме того, мы обсудим некоторые вопросы, связанные с химическими свойствами мембран и их химической совместимостью с фильтруемыми растворами, а также отдельные физические и биологические методы, применяя которые можно получить характеристики той или иной мембраны. Мы надеемся, что настоящая глава даст достаточную информацию, чтобы читатель мог легче ориентироваться в рекламной литературе по мембранам.

4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ПОР МЕМБРАН

Главным требованием при изготовлении мембран является их калибровка по средним и максимальным размерам пор. Идеальная мембрана должна иметь очень небольшой разброс размеров пор относительно среднего значения. В случае стерилизующей фильтрации вместо среднего размера пор определяющую роль играет максимальный размер, поскольку именно от него зависит то, какой должен быть самый большой размер частицы, чтобы она могла пройти сквозь мембрану.

Размер пор — это одна из наиболее широко обсуждаемых характеристик мембранных фильтров [он указывается, как правило, в микрометрах (мкм)]. Следует подчеркнуть, что лишь у трековых мембран (типа Нуклепор) размеры пор можно измерить под электронным микроскопом. У традиционных мемб-

ран с их сложной структурой (см. гл. 2) прямые измерения размеров пор невозможны, и для их определения используются косвенные методы, включающие в себя обычно расчеты с помощью математических моделей.

Оценка размеров пор. С самого начала следует предупредить читателя, что в своих каталогах фирмы-производители указывают размеры пор мембран с точностью, не соответствующей действительности. Здесь удачной представляется аналогия с размерами одежды. Размер мужской рубашки можно либо указать в виде числа, либо оценить приблизительно как малый, средний, большой или очень большой. Выраженный в числах размер дает ощущение точности, но равным образом можно приобрести рубашку, которая окажется впору, если пользоваться и менее точной маркировкой. Аналогично мембранные фильтры можно классифицировать либо приближенно, либо с помощью точных числовых значений размеров. На заре применения мембран фирма «Миллипор корпорейшн» для этого использовала буквенные обозначения; например, GS — для общей стерилизации, HA — для анализа гидрозолей и AA — для анализа аэрозолей. Впоследствии эти мембраны стали классифицировать в соответствии со следующими числовыми обозначениями размеров их пор: 0,22, 0,45 и 0,8 мкм. Хотя в каталогах фирмы «Миллипор» до сих пор еще можно встретить буквенные обозначения, используются они редко. К сожалению, как мы покажем ниже, точность, с которой указываются числовые значения размеров пор, не соответствуют действительности.

Для мембраны указывают либо номинальные, либо абсолютные размеры пор. **Номинальный размер** означает, что мембраной задерживается некоторая доля (во многих случаях до 98 %) общего количества частиц указанного размера, в то время как **абсолютный размер** означает, что все 100 % частиц указанного размера остаются на мембране. Заметим, что ни одна из этих маркировок не относится непосредственно к размерам пор, а подразумевает размер частиц, задерживаемых мембраной или фильтром. В первом приближении задерживание глубинными фильтрами (например, сделанными из стекловолокна) можно рассматривать как номинальное, тогда как задерживание мембранами — как абсолютное. Однако это лишь приближение. В промышленности вообще и в химико-фармацевтической в частности, где фильтрацию проводят обычно на мембранных фильтрах, последние обычно принято называть «абсолютными» фильтрами, но, как мы покажем в гл. 7, такое определение не совсем правильно.

Как же измеряют размеры пор мембран? В старых методах [23] для этого использовались суспензии коллоидных частиц золота стандартных размеров. Определяя размеры наименьших

частиц, которые проходят через мембрану, можно оценить лимитирующий размер пор. Хотя этот метод для своего осуществления не представляет каких-то трудностей, он имеет ряд ограничений. Во-первых, размеры частиц должны быть получены при помощи некоторого независимого измерения, например на электронном микроскопе или при ультрацентрифугировании. Во-вторых, на частицы, размеры которых меньше, чем размер пор, может оказывать задерживающее действие адсорбция, что ведет к ошибочным оценкам. Что касается использования стандартных бактериологических суспензий, то, хотя их и используют для проверки целостности мембран, применяемых для стерилизации (см. разд. 4.7 и гл. 7), для количественных оценок размеров пор такие суспензии вряд ли принесут большую пользу.

Метод точки пузырька. Этот метод получил наиболее широкое применение для определения размеров пор. И не только из-за своей простоты, но также и потому, что количественное измерение размеров пор с его помощью не влияет на начальные характеристики фильтра [125, 124, 115, 185, 57, 52, 119, 161, 16, 17]. Метод точки пузырька основан на эффекте капиллярности, согласно которому высота столбика воды в капилляре обратно пропорциональна диаметру последнего. Вода удерживается в капилляре силами поверхностного натяжения, и, если диаметр капилляра уменьшится, высота столбика воды возрастет. Однако воду, поднявшуюся в капилляре до определенной высоты, можно вернуть вниз давлением, величина которого эквивалентна высоте столбика воды в капилляре. Таким образом, измеряя давление, при котором вода вытесняется из капилляра, можно вычислить его диаметр. Применительно к мембранной фильтрации можно считать, что поры мембран эквивалентны капиллярам и вода удерживается в этих порах такими же, как и упомянутые выше, капиллярными силами.

Метод точки пузырька описывается в американском стандарте ASTM F 316 [17]. Фильтродержатель устроен таким образом, что верхняя часть мембраны контактирует с жидкостью, а нижняя — с воздухом (рис. 4.1, а). Корпус фильтродержателя соединен с источником сжатого воздуха, давление которого можно регулировать (рис. 4.1, б). Во время измерений давление воздуха постепенно поднимают, при этом в жидкости над мембраной отмечается появление пузырьков (рис. 4.1, в). При давлениях ниже точки образования пузырьков газ проходит через мембрану лишь вследствие диффузии, но, когда давление становится достаточно высоким, так что жидкость начинает вытесняться из пор, возникает объемное течение газа (рис. 4.2). При этом давлении пузырьки становятся хорошо заметными. Это переходное давление, называемое согласно ASTM F 316 «точ-

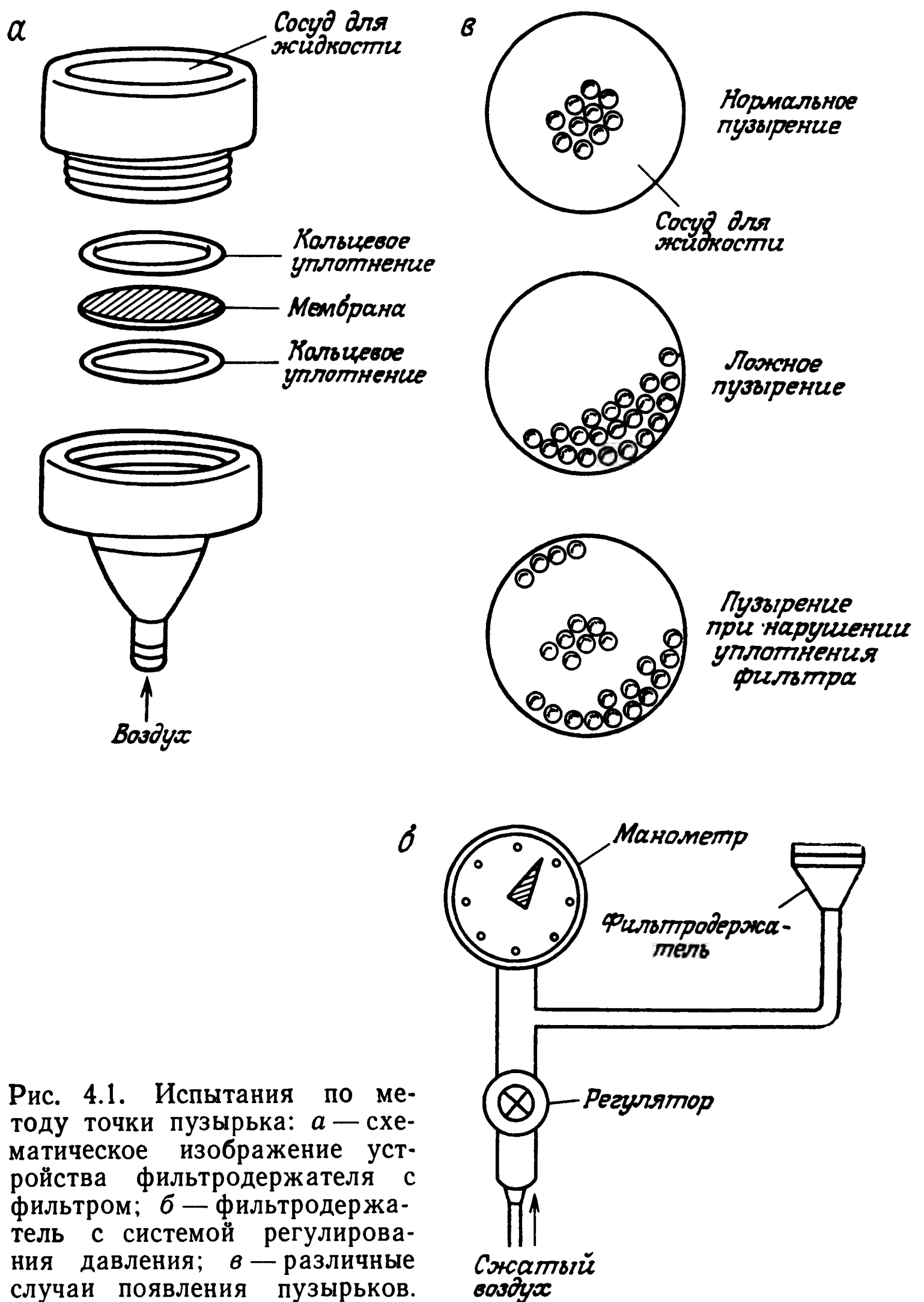


Рис. 4.1. Испытания по методу точки пузырька: а — схематическое изображение устройства фильтродержателя с фильтром; б — фильтродержатель с системой регулирования давления; в — различные случаи появления пузырьков.

кой пузырька», связано, как мы покажем ниже, с размером пор.

Среднее значение максимального диаметра пор в микронах дается следующей формулой [185]:

$$D = 4\gamma (\cos \theta) / P, \quad (1)$$

где P — точка пузырька, γ — сила поверхностного натяжения

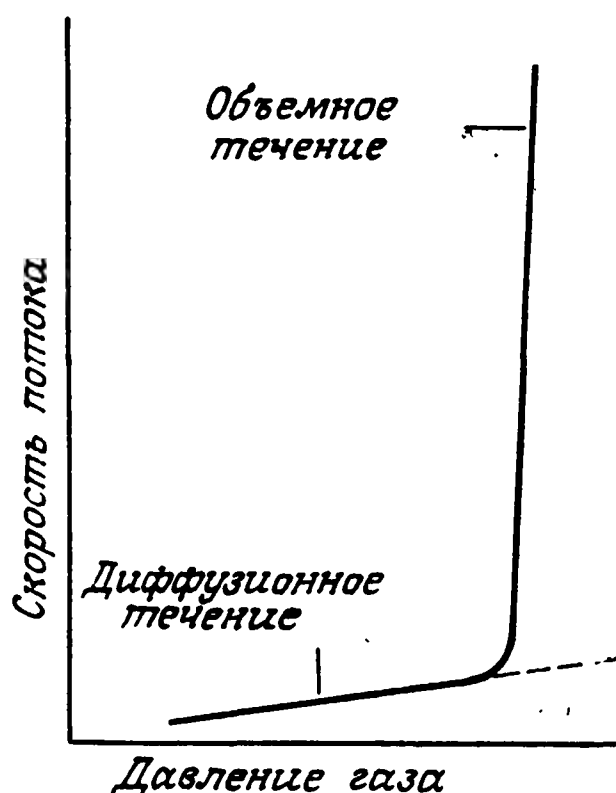


Рис. 4.2. Зависимость изменения скорости потока газа через мембрану от давления. При давлениях ниже точки пузырька имеет место лишь диффузия. В точке пузырька происходит резкая смена режимов.

жидкости (для воды 72 дин/см); θ — краевой угол смачивания мембраны (для воды принимается, как правило, равным нулю, поскольку вода практически идеально смачивает мембрану); D — диаметр поры.

Если принять краевой угол смачивания равным нулю, то для воды выражение (1) можно записать в более простом виде

$$D = 221,3/P,$$

где P — измеряется в см рт. ст.

В случае очень мелких пор давление, при котором достигается точка пузырька при фильтрации водных систем, может быть настолько велико, что материал мембраны окажется деформированным, а это, в свою очередь, сделает результаты недействительными. Для получения в этих условиях надежных значений давления, при котором достигается точка образования пузырьков, следует применять жидкости, у которых поверхностное натяжение меньше, чем у воды. Например, в случае минерального масла с силой поверхностного натяжения 34,7 дин/см выражение (1) принимает вид

$$D = 106/P,$$

где P измеряется в см рт. ст.

Еще одна жидкость, широко применяемая в рассматриваемом методе измерения размеров пор, — это изобутанол. Сила поверхностного натяжения изобутанола составляет 1,7 дин/см, что позволяет измерять поры, диаметр которых может быть в 40 раз меньше, чем при измерениях с использованием воды. Однако в этом случае необходимо удостовериться в том, что исследуемая мембрана не нарушается под действием изобутанола (нитроцеллюлозу изобутанол не растворяет, но целый ряд других материалов, из которых делают мембраны, он растворяет).

Ниже приводятся значения давления P , соответствующего точке пузырька для мембран из эфира целлюлозы с разными диаметрами пор (с использованием воды):

D , мкм	P , см рт. ст.
0,2	1075
0,8	268
1,3	165
8,0	26

Заметим, что это всего лишь теоретические значения. Как мы покажем ниже в данном разделе, в действительности значения точки пузырька меньше.

Если мембрана изготовлена не из нитроцеллюлозы, а из какого-то другого материала, то краевой угол смачивания мембраны водой будет иным, и для того же диаметра поры точка пузырька станет также другой [21]. Например, мембрана из полисульфона в патронных фильтрах Акрофлоу фирмы «Гелман» имеет точку пузырька на 20 % ниже, чем мембрана из нитроцеллюлозы.

Следует отметить одно важное обстоятельство, касающееся этого метода. Дело в том, что более крупные поры открываются раньше, а это ведет к тому, что расчетные размеры пор оказываются завышенными по сравнению со средними. Однако с точки зрения стерилизации большие поры первыми пропускают бактерии через мембрану. Кроме того, данный метод требует, чтобы образующиеся пузырьки были хорошо видны, а если в процесс фильтрации вовлечен большой участок мембраны, пузырьки могут оказаться незамеченными. Для определения точки пузырька необходимо также, чтобы мембрана была полностью увлажнена, поскольку даже одна сухая пора позволит воздуху проходить напрямую через мембрану, а это может привести к столь сильному искажению результатов измерения, что делает их просто бессмысленными.

Особенности определения точки пузырька. Строго говоря, представленные выше формулы для определения размера пор методом точки пузырька справедливы лишь в том случае, когда пора имеет цилиндрическую форму, а мы уже видели, что мембранные фильтры имеют извилистую пористую структуру. Тогда чему же в действительности соответствуют обозначения размеров пор, проставляемые на мембранах фирмами-производителями? Выше мы показали, что размеры пор мембран непосредственно не измеряют, их рассчитывают с помощью математических моделей, основанных на теории капиллярности. Все производители тем не менее указывают точные размеры пор для выпускаемых ими мембранных фильтров.

Здесь имеется дилемма. Размеры фильтрующихся частиц измеряются непосредственно под микроскопом, тогда как точка

пузырька для данной мембраны определяется из гидродинамических измерений. Форма поры оказывает существенное влияние на измеренное значение точки пузырька, поэтому в полученный расчетным путем размер поры следует внести поправку с учетом ее формы, используя своего рода фактор «выдумки». Фирма «Миллипор» [52, 176] использует выражение (1) с поправкой на форму пор в виде множителя K , который помещается в числителе этого выражения. То, каким образом получается этот множитель, авторы указанной литературы [176, 52] не приводят, однако известно, что он определяется опытным путем для каждого типа мембран. Можем ли мы теоретически получить соотношение, связывающее точку пузырька и размер некруглой в сечении поры?

Исходным здесь может служить то, что в выражении (1) участвуют две противоположные силы: одна — благоприятствующая потоку, и другая — препятствующая ему. Первая из них — сила поверхностного натяжения, которая является функцией периметра сечения поры, и вторая — гидростатическая, которая зависит от площади сечения поры. Таким образом, мы имеем

$$\text{Сила поверхностного натяжения} = (\text{Периметр сечения}) \cdot \gamma \cdot \cos \theta, \quad (2)$$

$$\text{Гидростатическая сила} = (\text{Площадь сечения}) \cdot P. \quad (3)$$

Поскольку точка пузырька характерна для состояния равновесия, выражения (2) и (3) можно приравнять друг другу:

$$(\text{Периметр сечения}) \cdot \gamma \cdot \cos \theta = (\text{Площадь сечения}) \cdot P. \quad (4)$$

Отсюда получаем следующее выражение для P :

$$P = \gamma \cdot \cos \theta \cdot \frac{\text{Периметр}}{\text{Площадь сечения}}. \quad (5)$$

Таким образом, давление, соответствующее точке пузырька, является функцией отношения периметра к площади сечения поры. Для случая круглого сечения длина периметра поры равна πD (здесь D — диаметр поры), а площадь поры равна $\pi D^2/4$. При этом выражение (5) можно переписать в виде

$$\pi D \gamma \cos \theta = (\pi/4) D^2 P, \quad (6)$$

откуда находим

$$D = 4\gamma (\cos \theta)/P. \quad (7)$$

Читатель легко заметит, что последнее выражение совпадает с формулой (1).

Можем ли мы теперь получить выражение для размера поры, определяемого по точке пузырька, если сечение поры не имеет форму круга? Изучение микрофотографий различных мембран,

сделанных с помощью растрового электронного микроскопа, показывает, что во многих случаях поры имеют приблизительно эллиптическое сечение. У эллипса две оси — большая и малая. Для целей фильтрации важную роль играет малая ось, поскольку ею определяется размер частиц, которые могут пройти сквозь мембрану. Если малую ось обозначить через D [по аналогии с диаметром D в выражении (7) для случая круглого сечения], а отношение большой оси к малой обозначить через E , то площадь эллиптического сечения запишется в виде

$$\text{Площадь} = (\pi/4) D^2 E.$$

Периметр эллипса можно в точности рассчитать, используя таблицы полных эллиптических интегралов, которые имеются в математических справочниках. Однако приблизительная формула имеет вид

$$\text{Периметр} = \pi D \sqrt{(1 + E^2)/2}. \quad (8)$$

Подстановкой обеих формул в (5) получим основную формулу для давления в точке пузырька при эллиптическом сечении поры:

$$D = 4\gamma \cos \theta \sqrt{(1 + E^2)/2} / EP. \quad (9)$$

Напомним, что E — отношение большой и малой осей. Для круга $E=1$, и вместо выражения (9) мы снова имеем формулу (7).

Чтобы проиллюстрировать, как можно пользоваться выражением (9), предположим, что точка пузырька равна $14,6 \text{ кг/см}^2$, при этом из выражения (7) следует, что расчетный размер пор, если они круглые в сечении, составляет $0,20 \text{ мкм}$. Для пор эллиптической формы с большой осью, вдвое превышающей малую ($E=2$), диаметр пор, рассчитанный по формуле (9), равен $0,16 \text{ мкм}$. Если же $E=10$, то расчетный диаметр равен $0,14 \text{ мкм}$. Таким образом, значение диаметра поры¹ в действительности меньше расчетного, полученного в предположении, что пора имеет круглое сечение. Отсюда следует, что допущение о круглом сечении поры, если это сечение на самом деле имеет форму эллипса, ведет к ошибке, поскольку диаметр поры в действительности меньше полученного из вычислений. Для нерегулярных пор мы не имеем возможности выполнить простые расчеты, как в случае поры эллиптического сечения, но принцип расчета остается тем же. Так, если необходима высокая эффективность стерилизации (а не высокая точность классификации по размерам), по-видимому, можно пренебречь геометрией пор и сде-

¹ Напомним, что речь здесь идет о среднем размере малых осей пор эллипсоидальной формы.— *Прим. ред.*

лать допущение о том, что они имеют круговое сечение, поскольку это дает нам дополнительный фактор безопасности.

Использование метода точки пузырька в реальных испытаниях. Одно из важнейших преимуществ метода точки пузырька — это то, что его можно осуществлять на мембранах в реальных условиях их применения независимо от размера их поверхности. Если необходимо проверить фильтр-патрон, то по сравнению со случаем плоской мембраны этот метод следует несколько видоизменить. При этом выходной конец патрона соединяют с трубкой, которую погружают в воду и определяют момент появления пузырьков на конце этой трубки. На рис. 7.2 показана схема установки для проведения испытаний мембранных фильтров в виде патронов или плоских дисков больших размеров в условиях полной асептики. Большинство фирм-производителей обычно проверяют каждый фильтр-патрон по завершении его изготовления перед отгрузкой. Однако, поскольку фильтр-патрон может быть поврежден при транспортировке, потребитель, прежде чем его использовать, должен провести повторную его проверку. Из-за складчатой формы мембраны в фильтр-патроне на выходе из патрона скапливается большое количество воздуха. При подъеме давления газа в начале испытательной процедуры складки мембраны будут слегка сжиматься, вытесняя удержанный воздух и побуждая пузырьки выходить с открытого конца трубки. Но это еще не точка пузырька. По мере дальнейшего роста давления пузырение должно прекратиться и начаться снова, когда будет достигнуто минимальное значение давления точки пузырька.

Заметим, что глубинные фильтры (из стекловолокна, тканого полимерного материала и т. п.) не могут быть проверены методом точки пузырька, поскольку под действием давления они деформируются и не сохраняют свою структуру. Для испытания таких фильтров следует использовать диффузионный метод, который обсудим ниже в настоящей главе.

Определение распределения пор по размерам методами продувки воздухом. Еще один параметр, который имеет важное значение и который согласно спецификациям на мембранные фильтры, принятым в США, необходимо определять, — **распределение пор по размерам**. Это — статистическое понятие, определяющее отклонение размеров пор от их среднего значения. В стандарте США ASTM F 316 описывается графический способ, позволяющий получить распределение пор по размерам. Этот метод требует измерения скорости воздушного потока через мембрану как во влажном, так и в сухом состоянии.

На рис. 4.3 приведена схема соответствующей установки для выполнения этих измерений. Процедура основана на том, что, когда при проверке мембраны методом точки пузырька на

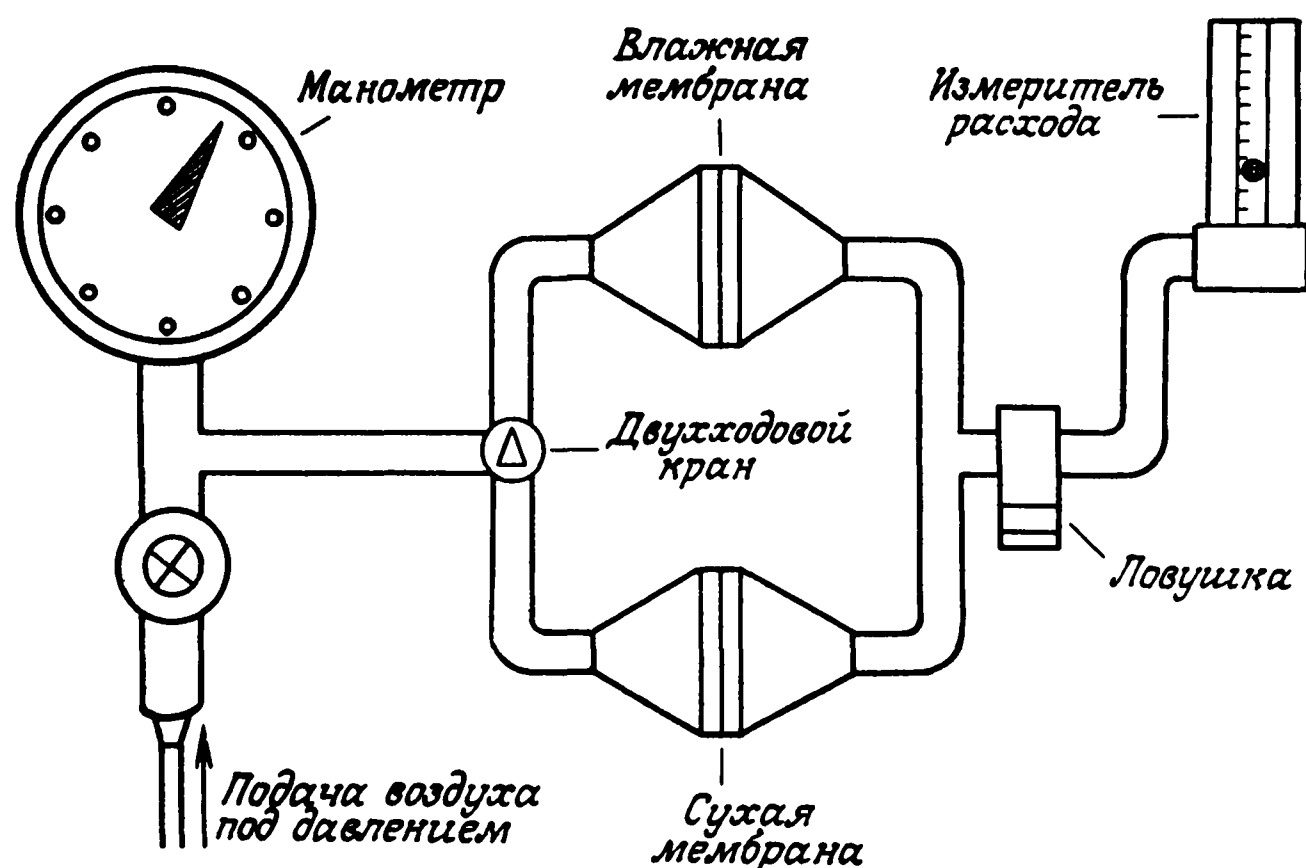


Рис. 4.3. Схема устройства для измерения скорости потока газа при различных перепадах давления через влажную и сухую мембрану. Эти измерения позволяют определить распределение пор по размерам; как это делается, показано на рис. 4.4.

ее входе создается давление воздуха, через поры мембраны начинает идти его поток, скорость которого можно измерить по вытеснению воды или с помощью расходомера на выходной стороне мембраны. Если бы все поры влажной мембраны были одного диаметра, то поток воздуха в точке образования пузырьков был бы равным потоку воздуха через сухую мембрану (поскольку все поры окажутся свободными от воды и, следовательно, сухими). В действительности размеры пор мембраны имеют некоторый разброс, и лишь самые большие из них освобождаются от воды в точке образования пузырьков. С дальнейшим возрастанием давления, после того как оно пройдет точку образования пузырьков, открывается все большее число пор и скорость потока воздуха увеличивается.

На рис. 4.4 представлены результаты измерений скоростей потока воздуха при различных давлениях через влажную и сухую мембраны, позволяющие определить средний размер пор. Средний размер пор соответствует тому давлению, при котором поток воздуха через влажную мембрану равен половине потока воздуха через сухую. (Размер пор, рассчитанный таким образом, иногда называют *среднепоточным*.) Распределение пор по размерам определяется по кривой для влажной мембраны, как показано кружком на рис. 4.4. Более подробно этот метод ASTM описывается в работе [139].

Метод продавливания ртути. Более точным методом определения размера пор мембранных фильтров, который к тому же

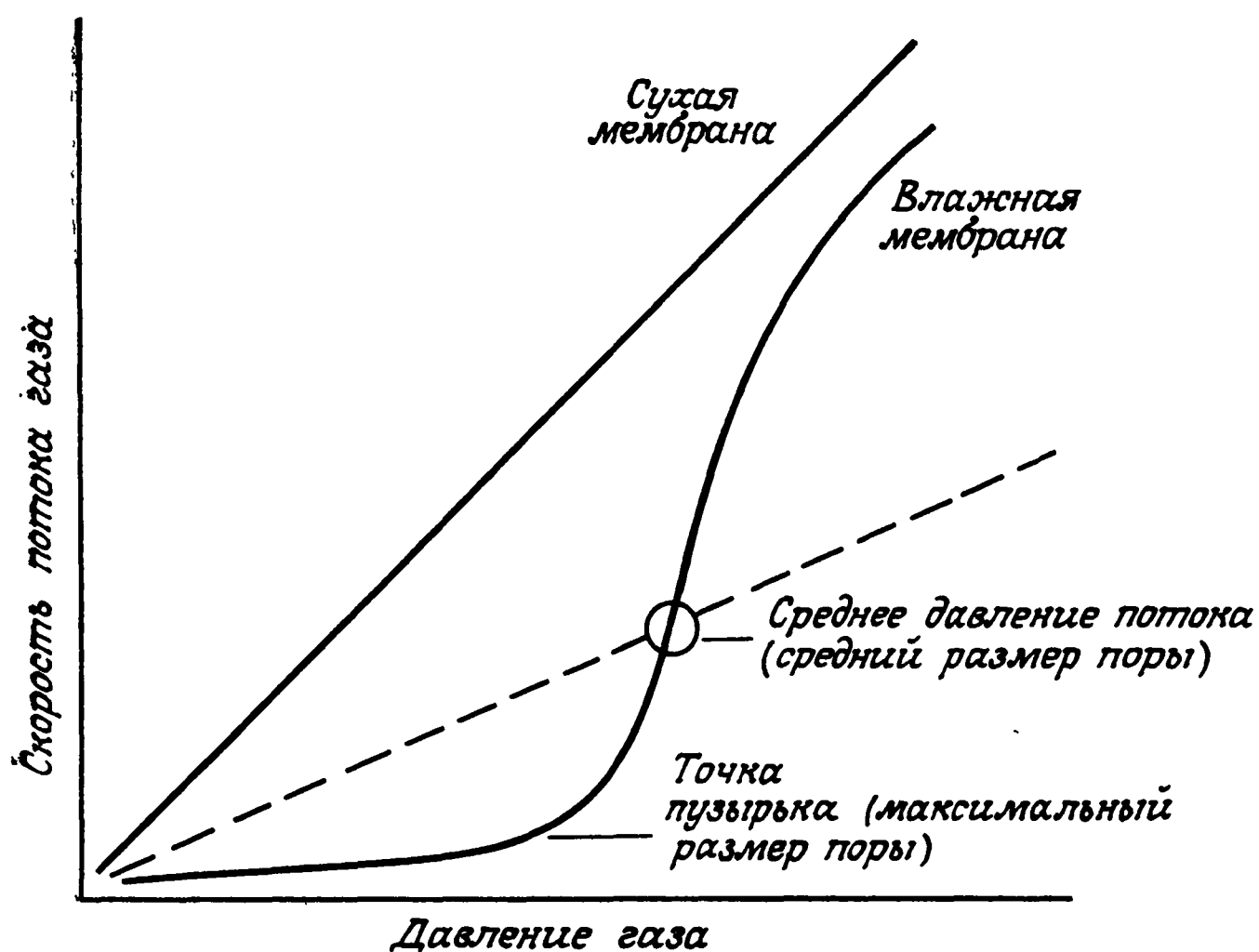


Рис. 4.4. Определение среднего размера пор и распределения пор по размерам путем одновременного измерения скоростей потоков газа через влажную и сухую мембраны (схема соответствующей установки приведена на рис. 4.3). Для расчета среднего размера пор по формуле для точки пузырька используется среднее давление. Плотность распределения пор по размерам выражается как доля потока, проходящего через поры с размерами, заключенными в определенном интервале. Для расчета этой доли из отношения скоростей потоков через влажный и сухой фильтры при высоком давлении следует вычесть отношение скоростей этих потоков при низком давлении; чтобы получить эту долю в процентах, полученную разность нужно умножить на 100. Значения скоростей всех потоков определяются из графика. Штриховая линия — половина потока через сухую мембрану (расчет).

дает информацию об объеме пор в мембране и о распределении их по размерам, является метод продавливания ртути. Он основан на том же эффекте капиллярности и явлении поверхностного натяжения, что и метод пузырька, но в качестве жидкости тут используется ртуть. Благодаря необычным физическим свойствам ртути можно выполнить весьма точные измерения. Метод продавливания ртути широко применяется в нефтяном деле и в текстильной промышленности [42] для измерения пористости и распределения пор по размерам; для мембранных фильтров его начали применять Хонольд и Скау [110].

Поскольку ртуть плохо смачивает материал мембраны, краевой угол смачивания превышает 90° , а это значит, что $\cos \theta$ отрицателен. При этом выражение (1) принимает вид

$$D = -4\gamma (\cos \theta) / P.$$

Краевой угол смачивания целлюлозы ртутью равен 140° , а сила

поверхностного натяжения 480 дин/см. Выражая диаметр поры в мкм, а давление — в кг/см², вышеприведенное выражение можно записать в виде

$$D = 15,13/P.$$

В методе продавливания ртути используют прибор, называемый дилатометром или поромером (этот прибор описан в работе [42] и производится в США фирмой «Америкэн инструмент» и в Италии — «Карло Эрба»). Сухую мембрану приводят в контакт со ртутью в сосуде, соединенном наверху с тонкой стеклянной трубкой, в которой можно измерить с высокой точностью объем ртути. После откачки воздуха и установления уровня ртути начинают небольшими ступенями повышать давление и фиксируют уменьшение объема ртути. Таким образом при каждом значении давления определяют объем ртути, вдавливаемой в поры образца мембраны. Если допустить, что при наиболее высоких давлениях (Хонольд и Скау использовали давление до 70 атм) заполняются все поры, то можно построить интегральную кривую, показывающую, какая доля пор в процентах имеет диаметр меньше некоторого данного размера. На рис. 4.5, а представлено несколько таких кривых для нитроцеллюлозных мембран.

Чтобы получить из интегральных кривых на рис. 4.5, а данные о распределении пор по размерам, их следует продифференцировать; полученные таким образом результаты показаны на рис. 4.5, б. Можно считать, что распределения по размерам на рис. 4.5, б соответствуют качеству современных мембран.

Объем пор, или пористость, мембраны можно также рассчитать на основе данных, полученных методом продавливания ртути. Объем пор определяется из измерений объема ртути, вдавливаемой в мембрану. Принимается, что при очень высоких давлениях (около 70 атм) в мембране все полости заполняются ртутью. Вычитая этот объем из объема, занятого порами при низком давлении, можно найти общий объем пор. Зная последний, оценивают пористость. Например, в работе [110] объем¹ ртути в дилатометре при низком давлении был равен 0,2655 см³, при высоком 0,0564 см³, объем пор, полученный как разность этих значений, составил 0,2091 см³. При этом рассчитанное значение пористости оказалось равным 79 %.

Хотя с помощью метода продавливания ртути можно получить достаточно точную характеристику мембраны, он имеет одно существенное ограничение. Его применение требует высоких давлений, а это может вызывать определенные деформации

¹ Изменение объема ртути в дилатометре при погружении в него мембраны.— *Прим. ред.*

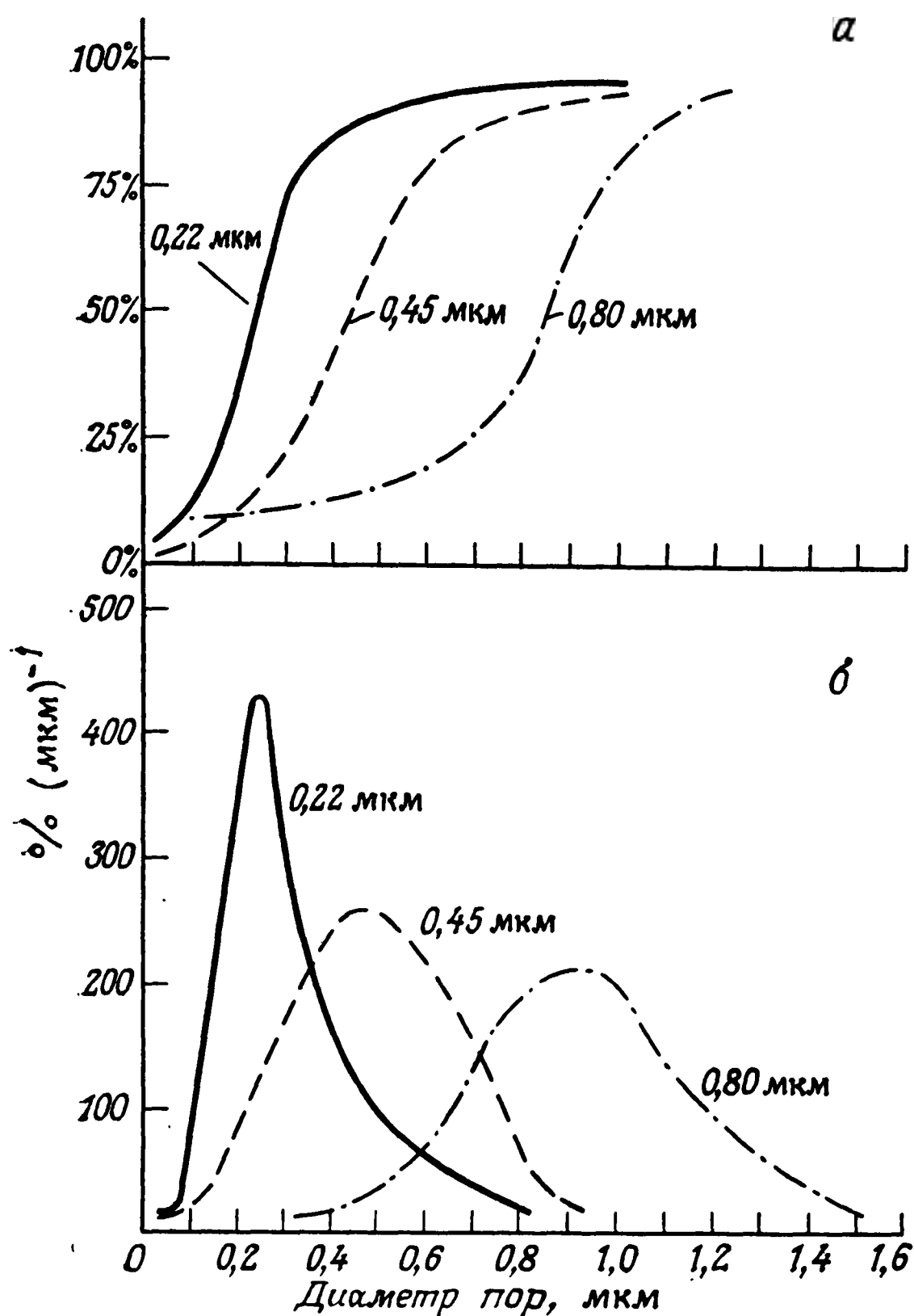


Рис. 4.5. Данные, полученные методом продавливания ртути через мембраны из нитроцеллюлозы. *а* — интегральные кривые, показывающие, какая доля пор в процентах заполняется ртутью при различных давлениях; радиусы пор рассчитаны из соотношения, связывающего размер поры с давлением; *б* — распределения пор по размерам, полученные графическим дифференцированием кривых на рис. *а*. Заметим, что мембраны с меньшими размерами пор имеют более узкие кривые распределения. (С разрешения фирмы «Оксонд», г. Бейзингсток, Англия.)

матрицы мембраны и, следовательно, изменения размеров пор или их структуры. При вычислениях среднего размера пор и их распределения приходится предполагать, что такой деформации не происходит.

Диффузионный метод. Этот метод представляет собой своего рода модификацию метода точки пузырька [185]. Согласно диффузионному методу, на влажной мембране создается постоянное давление, значение которого меньше давления в точке образования пузырька, и на выходе из мембраны измеряют фактический

поток газа по расходу вытесненной воды. Затем используют закон Фика для диффузии [176, 185] и соотношение Хагена — Пуазейля для ламинарного потока жидкости в капилляре [125]:

$$V = \frac{N\pi R^4 S P t}{8\eta l},$$

где V — объемный поток через мембрану, N — число пор на единице поверхности мембраны, S — поверхность мембраны, P — давление, t — время, η — вязкость, l — длина капилляра (эквивалентна¹ толщине мембраны) и R — радиус поры.

Из этого соотношения можно найти радиус поры R , подставляя в него остальные величины, полученные из измерений.

Рети [176] рассмотрел подробно этот метод и показал, что надежность получаемых с его помощью данных существенно зависит от используемого перепада давления. Первоначально фирма «Пол компани» предложила проводить испытания при относительно низких значениях перепада давления — порядка 10 % от значения давления в точке образования пузырьков. Однако при этих условиях скорость диффузии газа является в действительности функцией пористости, а не размера пор или целостности мембраны². Рети [176], а также Олсон и др. [161] рекомендуют проводить измерения диффузионным методом для перепада давления в установке, составляющего 80 % значения давления в точке образования пузырьков. На практике диффузионный метод наиболее широко используется в случае крупномасштабных фильтровальных установок, у которых периодически необходимо проверять целостность мембран. Первоначальный диффузионный метод фирмы «Пол», использующий небольшие перепады давления, все еще применяется при проверке целостности глубинных фильтров, так как последние нельзя проверять при перепадах давления, близких к значению точки образования пузырьков. Фирма «Пол» поставляет на рынок оборудование для проведения диффузионных испытаний мембран при условиях, близких к их эксплуатации.

Метод точки пузырька при проверке гидрофобных мембран. В случае мембран из гидрофобных материалов, например из тефлона, обычные испытания методом пузырька с использованием воды проводить нельзя, так как мембрана не смачивается. Однако при работе с водными системами проверка тефлоновой мембраны все же может понадобиться. Для этого случая подходит метод продавливания воды. Метод продавливания воды со-

¹ Это утверждение верно лишь для изотропных мембран. — *Прим. ред.*

² Кроме того, при низких давлениях могут оказаться незамеченными повреждения мембраны и дефекты уплотнения. — *Прим. ред.*

состоит в том, что с той стороны мембраны, где находится вода, постепенно повышают давление до тех пор, пока сухая сторона фильтра не станет влажной. Как правило, для мембраны из тефлона с размером пор порядка 0,2 мкм давление продавливания воды равно 1,8—2,1 атм. В случае фильтр-патронов, у которых невозможно увидеть увлажнение, можно измерять диффузионный поток с помощью описанного выше метода диффузии. Сначала патрон полностью увлажняют метанолом или этанолом, затем через него пропускают воду так, что спирт полностью вытесняется. После этого поднимают давление (1,4 атм для мембраны с порами 0,22 мкм и 0,7 атм для фильтра с порами 0,45 мкм) и по прошествии 5 минут, необходимых для стабилизации, измеряют диффузионный поток по вытеснению жидкости или по фактическому расходу воздуха. Этот метод можно применять для проверки целостности фильтр-патронов в действующих установках. По завершении испытания воду следует удалить, создав давление с противоположной стороны, чтобы подготовить патрон к дальнейшему использованию.

Заключительные замечания относительно метода точки пузырька. В этом разделе мы показали, что существует несколько различных методов для определения размеров пор и их распределения по размерам у мембранных фильтров. Наибольшую точность обеспечивает метод продавливания ртути, но он требует специального оборудования и использования столь высоких давлений, что может произойти деформация исследуемой мембраны. Наиболее удобным для тех, кто эксплуатирует мембраны, оказывается метод точки пузырька, который можно реализовать, применяя совсем несложное оборудование. Как показано в гл. 7, этот метод целесообразно применять при проверке целостности мембран, используемых для стерилизации. Производители мембранных фильтров обязательно указывают значения точки пузырька, которые потребитель может сравнить с аналогичными данными, получаемыми им на конкретной экспериментальной установке.

При сравнении значений точки пузырька, которые дают производители мембран, с теми, которые получаются расчетом по формуле (1), может оказаться, что они сильно отличаются друг от друга. Это отмечали Олсон и др. [161], а также многие другие исследователи. Это расхождение подтверждается данными, представленными в табл. 4.1. Фактические значения точки образования пузырьков всегда меньше теоретических, причем для пор небольших размеров — в несколько раз. Например, у мембран с диаметром пор 0,45 мкм фирмы «Миллипор», используемых для удержания жестких частиц размером более 0,47 мкм, точка образования пузырьков составляет 2,3 атм, тогда как она должна иметь значения 6,2 атм. Что это значит?

Как производитель решает, что мембрана с точкой образования пузырьков 2,3 атм имеет размеры пор 0,45 мкм, а не теоретически получаемый размер 1,27 мкм? Размер пор, равный 0,45 мкм, определяется методом продавливания ртути. Прежде же чем появился этот метод, использовали метод задержки частиц (см. разд. 4.6). В 1907 г. Бехгольд для согласования размеров пор, рассчитанных на основе данных измерения по методу пузырька и измеренных при испытаниях по методу продавливания ртути или по методу задержки частиц, предложил вводить поправку на явление капиллярности. В стандарте ASTM F 316 используется значение капиллярной постоянной,

Таблица 4.1. Теоретические и фактические значения точки пузырька (в атм) для мембранных фильтров различных фирм-изготовителей

Размер поры, мкм	Теор. значения	«Майкро- филтрейшн системс»	«Милли- пор»	«Гельман»	«Сарто- риус»	«Нуклепор»
8,0	0,37		0,28		0,32	0,14
5,0	0,59	0,70	0,42	0,28	0,62	0,28
3,0	0,97	0,91	0,70		0,77	0,42
1,2	2,44		0,84	0,70	1,08	
1,0	2,93	1,12				1,05
0,8	3,65	1,33	1,12	0,98	1,29	1,26
0,65	4,50	1,47	1,33		2,16	1,75
0,45	6,50	3,38	2,31	1,82	2,72	2,31
0,30	9,73	3,15	2,80	2,38	3,49	
0,22	13,30	3,85	3,85	3,15	3,96	4,2
0,10	29,26	7,63	17,5		8,74	>7

Теоретические значения рассчитаны по формуле (1) и из стандарта ASTM E 128 с использованием воды в качестве тест-жидкости. Фактические значения взяты из каталогов соответствующих фирм-изготовителей.

полученное Бехгольдом и равное 1,399; эта поправка оказалась вполне надежной для мембран с размерами пор 3,0 мкм и более. Для пор меньших размеров поправка должна соответственно увеличиться. Элфорд [68] приводит следующие экспериментальные данные:

Средний диаметр пор, мкм	Капиллярная постоянная
0,5—1,0	1,33—1,0
0,1—0,5	2,0—1,33
0,01—0,1	3,0—2,0

Фирма «Миллипор» приводит еще большие значения капиллярной постоянной; так, поправку 3 она дает к размерам пор менее 1,0 мкм (см. табл. 4.1).

Отличие теоретических значений от фактических обуславливают следующие два фактора: 1) форма пор, поскольку последние, как правило, не имеют правильной цилиндрической формы, и 2) неидеальная капиллярность, поскольку краевой угол смачивания мембраны жидкостью в действительности не равен нулю (Wayne Olson, частное сообщение). Что касается формы поры, то, как мы уже видели, допущение о круглой форме сечения поры вместо действительной эллиптической приводит к поправочному множителю, равному примерно 1,4, что близко к значению капиллярной постоянной Бехгольда. Поправка же, равная 3 и более для пор размером 0,45 мкм и меньше, обусловлена неправильным допущением о величине краевого угла смачивания. Чем меньше диаметр пор, тем большее влияние на определение размеров пор мембран оказывают ошибки в измерении краевого угла.

Каково же распределение пор по размерам? Наиболее точно эту характеристику можно определить, продавливая через мембрану ртуть. К сожалению, не все фирмы-производители приводят данные по продавливанию ртути для своих мембран. Наилучшие данные (см. рис. 4.5), которые мне когда-либо приходилось встречать, были представлены фирмой «Оксид» для мембран, сделанных по ее заказу фирмой «Курто». Маршалл и Мельцер [146] привели данные по продавливанию ртути через поры диаметром 0,45 мкм для мембран различных фирм-производителей. В каталоге фирмы «Сарториус» специально отмечается, что указанные размеры пор (преимущественно средние значения диаметров) мембран получены методом продавливания ртути.

Фирма «Миллипор» также использует методы продавливания ртути [155], но не сообщает об этом в своих каталогах. Установлено, что размеры пор мембран фирмы «Миллипор» имеют очень небольшой разброс, и данные работы [155] (для мембраны с порами 0,45 мкм) с очевидностью подтверждают это. Однако Маршалл и Мельцер [146] приводят убедительные доводы, что на самом деле эти столь узкие распределения пор по размерам не существуют, по крайней мере для мембран, приобретаемых потребителями на рынке. Данные для распределения размеров пор, которые приводят Маршалл и Мельцер по мембранным фильтрам четырех различных фирм (одна из них почти определено является фирмой «Миллипор»), весьма близко напоминают кривые на рис. 4.5. Эти авторы задаются вопросом, необходимы ли столь узкие распределения пор по размерам, которые дает фирма «Миллипор», в свете того что мембраны достаточно быстро забиваются при фильтрации суспензий, содержащих частицы с размерами, близкими к размерам пор мембраны.

Наше обсуждение уместно заключить следующей цитатой из работы [145]:

«В настоящее время различные фирмы, производящие мембраны, необязательно используют один и тот же метод определения пористости своей продукции. Поэтому одно и то же цифровое обозначение размера пор мембран двух различных производителей совсем не означает, что обе мембраны действительно имеют одинаковые размеры пор. Однако следствия, к которым приводит это отсутствие унификации в измерении пор, могут быть преувеличенными: долгое время успешно практиковалась взаимозаменяемость мембран с близкими размерами пор, изготовленных различными компаниями. Тем не менее стандартизация отсутствует, и возможность в неоднозначном определении размеров пор существует».

Для фактической оценки мембран потребители с полным доверием могут принимать значения точек образования пузырьков, приводимые фирмами-производителями. Хотя значения точки пузырька не дают самих величин размеров пор, они позволяют потребителю проверить целостность мембраны. Приведенные в табл. 4.1 данные относятся к мембранам из нитроцеллюлозы или из смешанных эфиров целлюлозы (или, как в случае мембранного фильтра Нуклепор, из поликарбоната). Заметим, что мембраны из полисульфона, тефлона или из других полимеров имеют существенно меньшие значения точки образования пузырьков.

Заключая этот раздел, укажем, что, хотя физические методы (например, метод точки пузырька) применялись и их можно применять для определения размеров пор мембран, во многих случаях оценку размеров пор можно получить и методами задержки частиц (например, бактерий), описываемыми в разд. 4.6 и 4.10. Однако метод точки пузырька обеспечивает простой, удобный и неразрушающий способ измерения размеров пор мембран, если для данного типа мембраны установлена связь между способностью мембраны задерживать частицы и значением точки пузырька.

4.3. ФИЗИЧЕСКИЕ И МЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Физические и механические характеристики мембран имеют важное значение с точки зрения их успешного использования в различных областях. Целью настоящего раздела является краткое описание некоторых свойств мембран.

Толщина мембраны контролируется в процессе ее изготовления и определяется природой самой мембраны и условиями ее изготовления. Толщину измеряют специальным прецизионным микрометром. Толщина мембран находится, как правило, в пределах 10 %-ного отклонения от требуемого значения.

Толщины типичных мембранных фильтров из эфиров целлюлозы, применяемых при бактериологических работах, несколько изменяются в зависимости от размеров пор и лежат в пределах 90—170 мкм. Трековые мембраны Нуклепор являются значительно более тонкими; их толщина порядка 10 мкм. Для сравнения укажем, что толщина фильтровальной бумаги, применяемой при обычной химической фильтрации (например, Ватман № 1), составляет 180 мкм, а глубинные фильтры из тонкого стекловолокна (Ватман GF/C; номинальный размер пор 1,5 мкм) имеют толщину около 260 мкм. Чем толще мембрана, тем больше походит она на глубинный фильтр и тем меньше на экран или сито. Для стерилизации, в особенности при больших объемах фильтруемого материала, могут оказаться предпочтительными более толстые мембраны, поскольку они медленнее забиваются и обладают лучшими характеристиками по задержке. Они должны также быть более прочными механически (см. ниже).

Во многих случаях важное значение имеет способность мембранных фильтров работать на **растяжение и сжатие**. Свойство работать на растяжение можно охарактеризовать количественно физическим параметром, называемым *модулем упругости*, либо напряжением разрыва или удлинением разрыва [125]. Способность мембраны работать на сжатие, имеющая важное значение при ее эксплуатации, характеризуется количественно влиянием сжатия на проницаемость мембраны. Если мембрана подвергается необходимому давлению в течение какого-то периода времени и ее проницаемость затем повторно устанавливают путем замера изменения расхода воды при контролируемых условиях, то можно сделать некоторую оценку устойчивости мембраны к сжатию. Это свойство представляет интерес в тех случаях, когда в целях увеличения пропускной способности мембраны поднимают давление.

Другим важным физическим свойством мембранных фильтров является их способность сохранять одинаковым диаметр пор по глубине мембраны. Мембраны, у которых по их глубине диаметры пор сохраняются примерно одинаковыми, называются **изотропными** и, наоборот, мембраны с изменяющимися по глубине диаметрами пор — **анизотропными**. Простым методом установления степени анизотропности мембраны является ее **фитильное испытание**. Метод состоит в том, что наполненное чернилами капилляр-перо приводят в соприкосновение с какой-либо стороной мембраны и чернилам дают возможность протечь в мембрану. Круглые пятна неравного диаметра на разных сторонах мембраны указывают на ее анизотропность, тогда как в случае ее изотропности чернильные пятна будут иметь одинаковые размеры. Степень анизотропности (СА) мембраны опре-

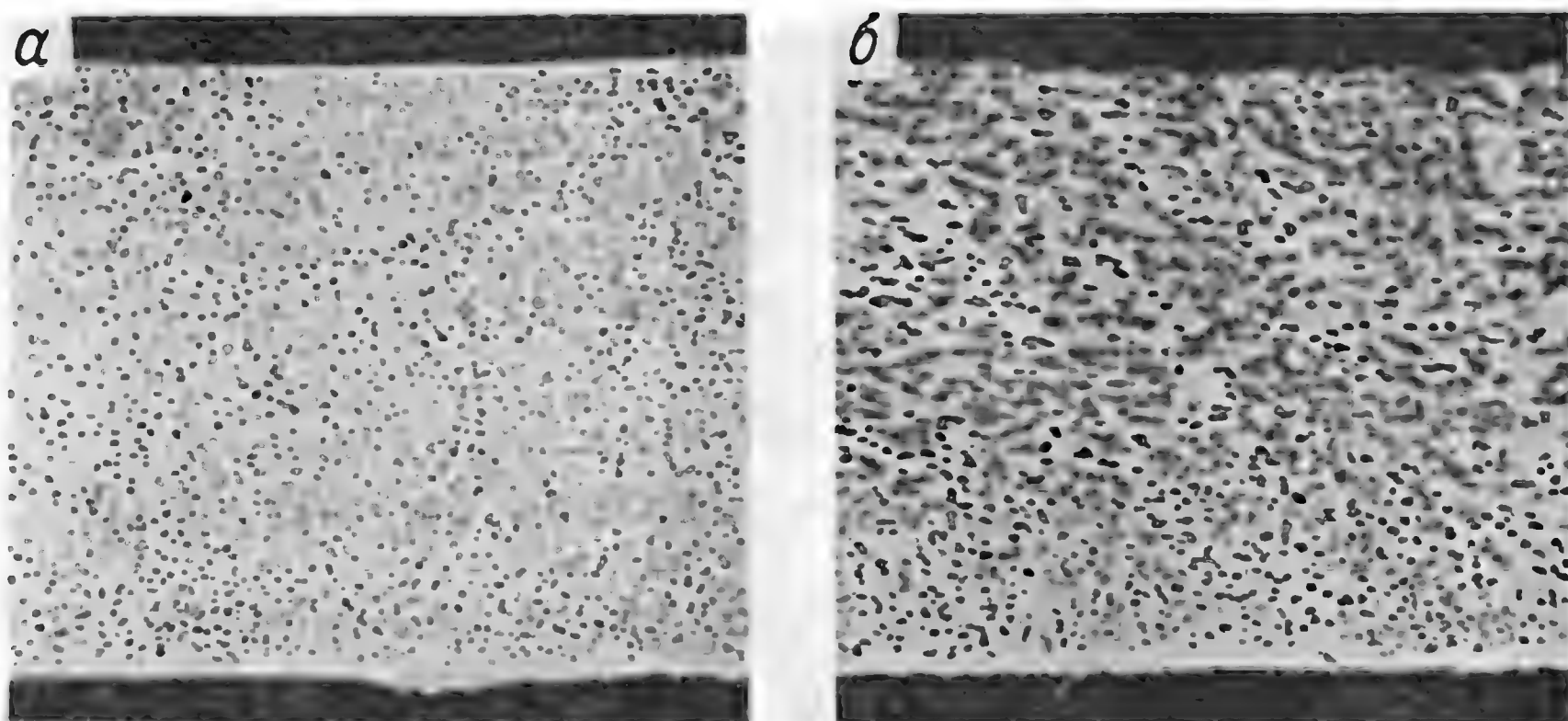


Рис. 4.6. Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, поперечных сечений обычной (изотропной) мембраны (а) и анизотропной мембраны (б). Толщина мембран 115 мкм. (Из работы [124] с любезного разрешения Р. Кестинга.)

деляется количественно как отношение размера пор с грубой стороны¹ (где они широкие) к размеру пор с тонкой стороны² (где они узкие) [124]. У изотропных мембран $CA < 2$, у умеренно анизотропных $CA = 3$, а у сильно анизотропных $CA = 5$. В силу самого процесса изготовления все мембраны обладают некоторой степенью анизотропности (в гл. 3 мы упоминали о том, что мембраны сетчатого типа делают методом отливки на поверхность, и сторона, обращенная к воздуху, несколько отличается от нижней стороны из-за различных условий испарения растворителя). Преимуществом анизотропных мембран по сравнению с изотропными является то, что при одинаковой селективности они обладают большей удельной производительностью и меньше забиваются. Кроме того, при использовании анизотропных мембран достигается более высокая точность подсчета числа жизнеспособных бактерий вследствие того, по-видимому, что бактерии могут сгруппировываться внутри более крупных пор с грубой стороны мембраны, где их окружает питательная среда, и поэтому может начаться более эффективный их рост [198] (см. разд. 10.6). На рис. 4.6 показаны тонкие структуры обычных и сильно анизотропных мембран.

Простым способом проверки однородности мембран является испытание на проникновение красителя. Поддерживая мембрану

¹ То есть со стороны поддерживающего слоя (подложки) мембраны.— *Прим. ред.*

² То есть со стороны селективного слоя мембраны.— *Прим. ред.*

за край, касаются нижней ее стороны водным раствором 1 %-ного метиленового синего и наблюдают, как краситель распространяется по мембране. Последняя должна быть смоченной красителем равномерно; если имеется какой-то гидрофобный участок, он будет либо покрашен слабее, либо совсем не покрашенным. Мембраны с непокрашенными участками, сколько бы их ни было, выбраковываются.

4.4. ЗАБИВАНИЕ ПОР И СКОРОСТЬ ФИЛЬТРАЦИИ

Скорость, с которой вода проходит через мембрану при фильтрации, является функцией как размеров пор, так и их плотности, т. е. их количества на единице поверхности мембраны. По мере блокирования пор частицами (рис. 4.7) эффективная пористость мембраны и скорость фильтрации падают. Таким образом, для практических целей очень важно знать, как работает мембрана, т. е. скорость фильтрации и скорость забивания.

Простой способ определения скорости фильтрации заключается в помещении мембраны в систему с контролируемым перепадом давления на мембране и в определении скорости прохождения через нее известного объема осветленной (профильтрованной) воды. Даубнер и Петер [57] при перепаде давления 70 мм рт. ст. измеряли время, за которое через мембрану проходит 100 мл воды, принимая значение этого времени как меру качества мембраны. Это «время фильтрации», известное в старой литературе как фактор Z (от немецкого *Zeit* — время), использовалось ранее для расчета размера пор, но в действительности оно имеет лишь относительное значение и его нельзя связывать непосредственно с размером пор¹.

Многие фирмы-производители в инструкциях по эксплуатации мембран приводят данные по скорости фильтрации, полученные при различных давлениях. Они используют метод, который позволяет определить скорость потока чистой (предварительно профильтрованной) воды в миллилитрах в минуту через квадратный сантиметр поверхности мембраны. Перепад давления на мембране можно контролировать с помощью установки типа изображенной на рис. 4.8. Поскольку скорость фильтрации зависит от вязкости, а вязкость есть функция температуры, необходимо следить за температурой воды, причем в качестве стандартной температуры предлагается 20 °С.

¹ Необходимо учитывать также структуру мембраны (степень ее изотропности по толщине).— *Прим. ред.*

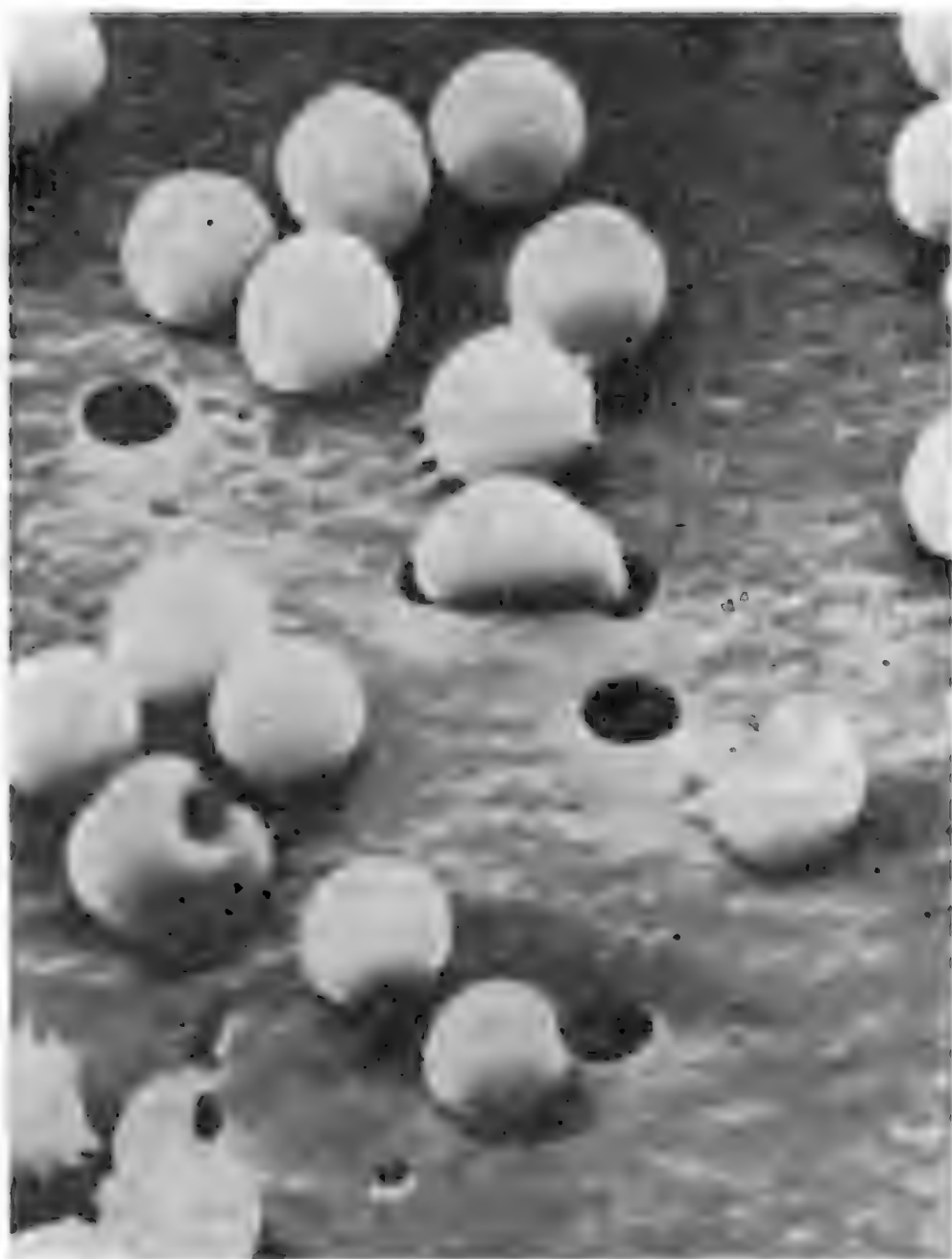


Рис. 4.7. Забивание мембран Нуклепор эритроцитами. Диаметр эритроцитов равен примерно 7 мкм. (С разрешения д-ра Шу Чиена, Колумбийский университет.)

На рис. 4.9 представлены данные для некоторых типов мембран. Можно наблюдать широкий диапазон скоростей потока. Несмотря на то что скорость потока жидкости через мембрану зависит главным образом от размеров пор, очевидно все же, что и другие факторы оказывают свое влияние, поскольку через одну и ту же мембрану при тех же номинальных размерах пор фильтрация идет с существенно разными скоростями. Отчасти это можно объяснить анизотропностью мембраны; для данного размера пор скорость потока воды через анизотропную мембрану выше, чем через изотропную.

Скорость забивания, выражающаяся в уменьшении скорости потока жидкости через мембрану со временем при том же давлении, является с практической точки зрения одной из наиболее важных характеристик мембраны. Чем меньше скорость забивания мембраны, тем больший объем жидкости можно профильтровать, прежде чем мембрана будет заменена. Скорость забивания лучше всего измерять методом затухания потока. В этом методе через отдельную мембрану при постоянном давлении пропускают жидкость возрастающего объема и измеряют скорость потока жидкости. Типичные результаты такого измерения приведены на рис. 4.10, откуда видно, что скорость забивания

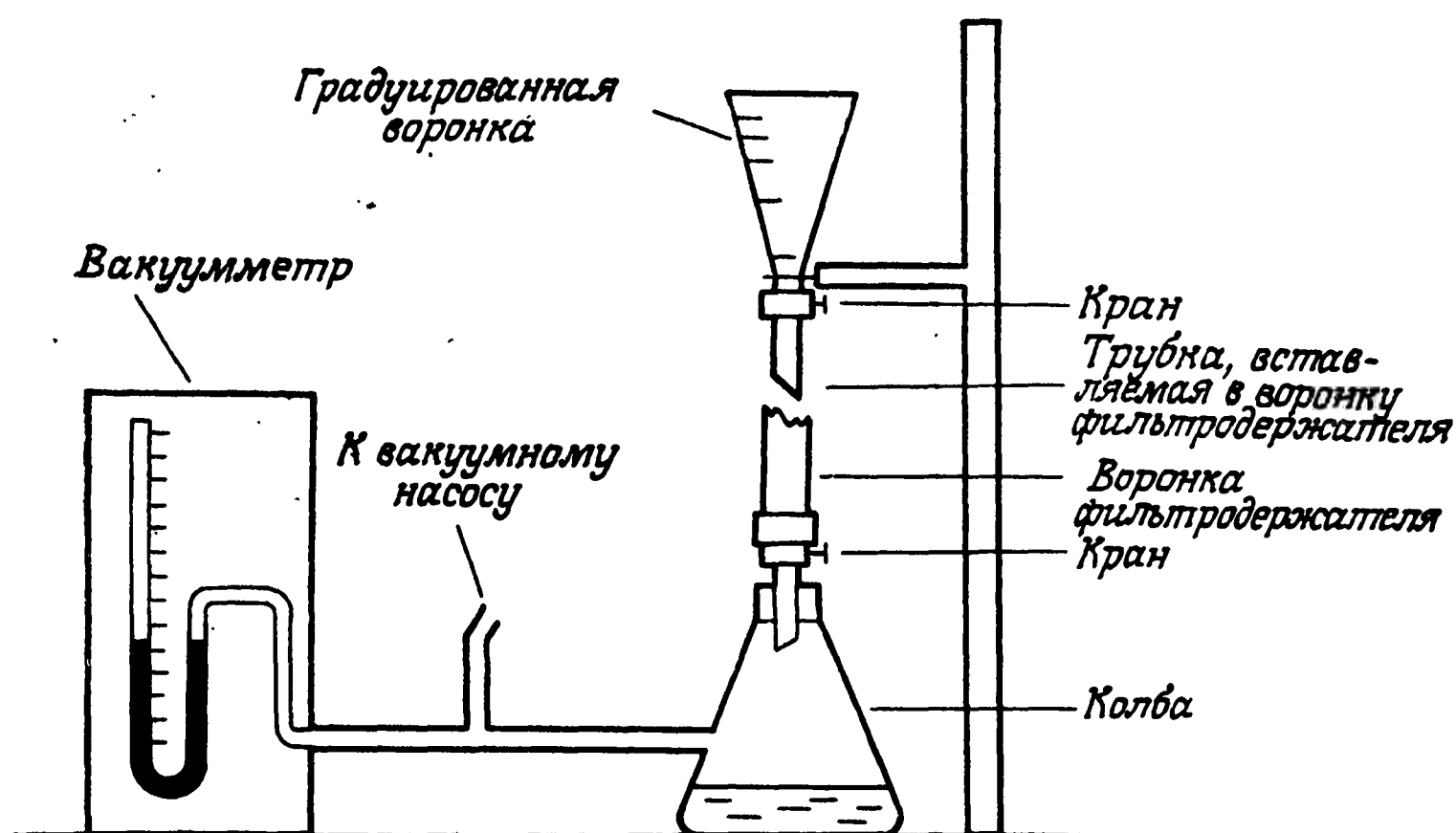


Рис. 4.8. Простая установка для определения скорости потока воды через мембранный фильтр. Градуированная воронка и фильтродержатель заполнены фильтруемой через мембрану водой. При двух закрытых кранах система подсоединяется к вакуумному насосу. По достижении необходимого давления (рекомендуемое давление равно 70 мм рт. ст.) краны открываются и регистрируются промежутки времени, за которые проходят различные объемы воды. (Согласно работе [57].)

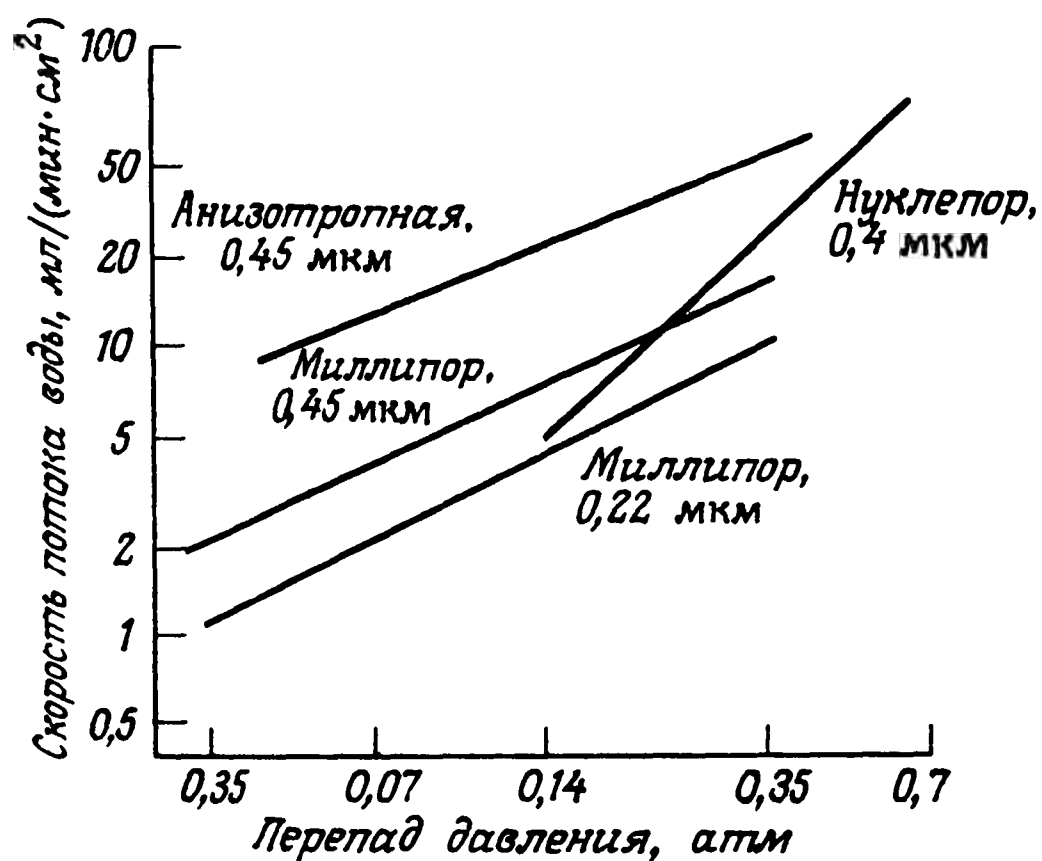
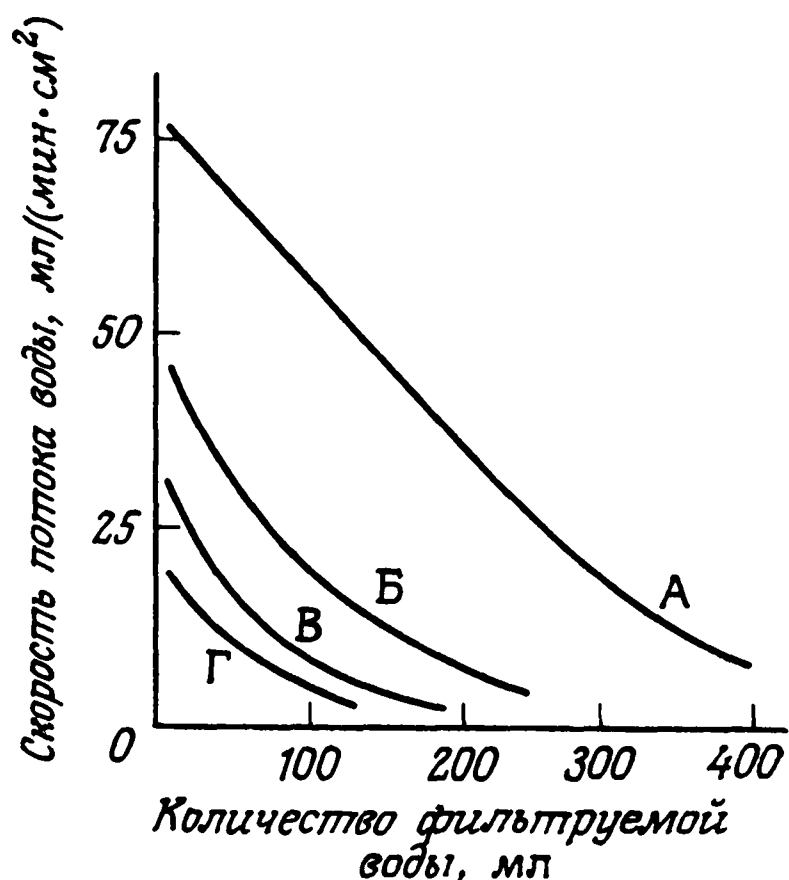


Рис. 4.9. Зависимость скорости потока воды от перепада давления для различных типов мембран. Данные для анизотропной мембраны заимствованы из работы [124], остальные — из технической документации соответствующих фирм.

Рис. 4.10. Скорость забивания некоторых типов мембран, определяемая по уменьшению скорости потока фильтруемой жидкости с увеличением ее объема. В данном случае фильтруемая жидкость представляла собой 0,01 %-ный раствор детергента Тритон Х-400. А — анизотропная мембрана; Б — мембрана из смеси эфиров; В — полиамидная (найлоновая) мембрана; Г — мембрана из поливинилиденфторида (по-видимому, мембрана Дюрапор из гидрофильного материала). (Из работы [124].)



в значительной мере зависит от степени анизотропности мембраны. У сильно анизотропных мембран поры большего размера на верхней стороне удерживают, по-видимому, более крупные частицы, которые и закрывают поверхность мембран, но при этом жидкость все же продолжает проходить через нее.

В связи с тем что на скорость забивания оказывают сильное влияние плотность распределения пор, мембраны с низкой пористостью, такие, как Нуклепор, забиваются быстро¹. Одним из способов, который позволяет продлить работу забитой мембраны, является **обратная промывка**, при которой часть потока пропускают через мембрану обратным ходом; при этом задержанные частицы освобождают устья пор и поток жидкости в прямом направлении восстанавливается. Обратная промывка имеет важное значение лишь для больших фильтровальных установок, где существенна стоимость фильтрующего материала.

В тех случаях, когда забивание мембран и фильтров приводит к значительным трудностям, можно прибегнуть к предварительной фильтрации, чтобы удалить более крупные частицы. Наиболее подходящими для этой цели являются, например, фильтры из стеклянного микроволокна. Они действуют как глубинные фильтры и могут быть получены с номинальным размером пор менее 1 мкм. На рис. 2.9 представлены сравнительные данные по скорости забивания мембранного фильтра и фильтра из стеклянного микроволокна при одинаковом номинальном размере пор.

¹ На скорость закупорки пор мембран оказывает влияние не только величина пористости, но и структура пор мембран, а также физико-химические особенности их поверхности.—Прим. ред.

Результаты тщательных исследований скоростей забивания различных мембранных фильтров при пропускании через них питательных сред для микробиологических анализов приводятся в работе [193]. Фильтрация таких суспензий с высокой концентрацией частиц ведет к быстрому забиванию мембран, при этом на процесс оказывают влияние различные факторы. Одним из наиболее важных факторов является степень анизотропности мембран; даже у не сильно анизотропных мембранных фильтров верхняя и нижняя стороны имеют разные скорости забивания. Некоторые из фирм-изготовителей рекомендуют ориентировать выпускаемые ими мембраны определенным образом, другие же считают, что для их мембран не имеет значения, какой стороной они будут обращены к фильтруемой жидкости. Как правило, каждая мембрана помещается в упаковке таким образом, что ее верхняя сторона соответствует той, которая при изготовлении мембраны соприкасалась с воздухом и должна иметь меньшие размеры пор. Однако следует подчеркнуть, что для многих областей применения процесса фильтрации ориентация мембраны в фильтродержателе не имеет значения¹.

4.5. ХИМИЧЕСКАЯ СОВМЕСТИМОСТЬ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ С ФИЛЬТРУЕМОЙ СРЕДОЙ

Во многих случаях промышленного применения и в научных исследованиях мембранные фильтры используют для фильтрации растворов или суспензий не в воде, а в других жидкостях. Мембранные фильтры в разной степени чувствительны к фильтруемым жидкостям — спиртам, углеводородам, кислотам, щелочам и другим необычным растворителям типа используемых в фотографии или в промышленности. Практически во всех случаях очень важно подвергнуть проверке материал мембраны на совместимость с жидкостью. Проверка заключается в том, что через серию мембран пропускают растворитель или раствор при тех же температурах и за то же время, при которых она будет эксплуатироваться. Факт влияния жидкости на мембрану можно установить и визуально. Измерения же дают возможность определить изменение диаметра дисковых мембран; обычно при действии растворителя на материал мембраны диа-

¹ Это справедливо главным образом, если продуктом является раствор, прошедший через мембрану (фильтрат). В том же случае, если продуктом является концентрат (та часть фильтруемой среды, которая осталась над мембраной), анизотропную мембрану необходимо ориентировать селективным слоем (рабочей стороной) к концентрату.— *Прим. ред.*

метр диска увеличивается. Если нельзя заметить очевидных изменений, то следует проверить целостность обработанной мембраны посредством измерения скорости потока жидкости, как описывалось выше, и определить точку образования пузырьков (см. разд. 4.2). Вообще говоря, можно обнаружить, что, если мембрана подверглась воздействию растворителя, скорость потока жидкости уменьшится, а давление, соответствующее точке пузырьков, возрастает. Это происходит вследствие того, что растворитель вызывает пластификацию материала мембраны, что влечет ослабление напряжения молекулярной цепи в полимере. Полимерные цепи поэтому набухают, что приводит к уменьшению размеров пор. Некоторые изменения материала мембраны под действием растворителя можно обнаружить с помощью растрового электронного микроскопа. Читатель, интересующийся вопросами совместимости мембран, может обратиться к работе Лукашевича и Мельцера [144].

Можно отметить четыре степени воздействия растворителя на материал мембраны:

- 1) отсутствие химического действия;
- 2) легкое набухание или деформация мембраны; мембрана может оказаться совместимой с растворителем при кратковременном использовании;
- 3) сильное набухание и постепенное растворение материала мембраны;
- 4) полное растворение или разложение мембраны.

Совместимость мембраны с данным растворителем будет определяться химической природой мембраны, а также температурой и давлением обработки. При определении химической устойчивости мембран к тем или иным растворителям следует помнить следующее:

1. Мембраны из нитроцеллюлозы чувствительны к действию большинства растворителей (исключая алифатические углеводороды), а также кислот и щелочей. К органическим растворителям обычные мембраны устойчивы.

2. Совместимость мембран из ацетилцеллюлозы такая же, как и у мембран из нитроцеллюлозы, за исключением того, что первые более устойчивы к действию спиртов.

3. Мембраны из регенерированной целлюлозы устойчивы к действию большинства растворителей, но неустойчивы к действию кислот и щелочей.

4. Мембраны из винила устойчивы к действию спиртов и щелочей, но неустойчивы против большей части растворителей и кислот.

5. Мембраны из поливинилхлорида устойчивы к действию большинства растворителей, но чувствительны к кислотам, кетонам и диоксану.

6. Акриловые мембраны чувствительны к кислотам и кетонам, но стойки к действию большинства других растворителей.

7. Мембраны из нейлона устойчивы к действию большинства растворителей, но нестойки к кислотам.

8. Трековые мембраны Нуклепор из поликарбоната устойчивы по отношению к большей части кислот и органических растворителей (за исключением галогенированных углеводородов) и чувствительны к сильным щелочам.

9. Тефлоновые (PTFE) и другие фторуглеродные мембраны стойки против действия почти всех веществ. Мембраны Дюрапор фирмы «Миллипор», сделанные не из тефлона, а из других фторуглеродов, по сравнению с тефлоновыми несколько менее стойки к действию растворителей. Например, к числу растворителей, к которым в противоположность тефлоновым мембранам материал мембран Дюрапор не устойчив, относятся ацетон, горячая серная кислота, н-бутиламин и диметилформамид.

10. Мембраны из альгината алюминия (см. разд. 3.8; возможно, они поставляются западно-германским отделением фирмы «Сарториус») могут стать растворимыми в воде после обработки их раствором лимонно-кислого натрия. Эти мембраны можно использовать для фильтрации водных растворов в том случае, когда необходимо выделить конкретное вещество, задерживаемое мембраной.

Следует указать также на два следующих аспекта химической устойчивости мембран: 1) если вредный компонент содержится в фильтруемой жидкости в небольших количествах, то его отрицательное воздействие на мембрану может быть незначительным; 2) кроме того, мембраны могут подвергаться нежелательному воздействию смеси веществ, каждое из которых в отдельности является безвредным. Таким образом, прежде чем использовать ту или иную мембрану, необходимо выяснить, совместим ли химически с фильтруемой жидкостью материал выбранной вами мембраны.

Каждая фирма, изготавливающая мембраны, тщательным образом испытывает их на химическую совместимость. Подробная информация либо содержится в технической документации, прилагаемой к мембране, либо ее можно получить у представителей фирмы.

Наряду с устойчивостью мембран к различным растворителям необходимо учитывать последствия, к которым может приводить стерилизация мембран. Большинство мембран стерилизуют автоклавированием или в среде газообразной окиси этилена, однако здесь нужно учитывать некоторые нежелательные последствия. Стерилизация мембранных фильтров подробно рассматривается в гл. 7.

4.6. МЕТОДЫ ЗАДЕРЖКИ БАКТЕРИЙ

Нередко для оценки характеристик мембранных фильтров применяют методы задержки тест-бактерий. С помощью этих методов можно определять размеры пор и оценивать пригодность мембран для стерилизации жидкостей в условиях, близких к реальным. Хотя метод пузырька является общепринятым для определения размеров пор мембран, измерения по методу задержки тест-бактерий подкрепляют уверенность в том, что испытания по методу пузырька дают правильные результаты.

В общепринятом методе задержки тест-бактерий на мембрану под давлением подают большое количество суспензии бактерий, а стерильность фильтрата определяют его посевом в питательной среде. Чувствительность метода очень высока, поскольку на мембрану может быть подано много бактерий. Два подобных метода испытаний мембран посевом бактерий описаны в стандартах ASTM. Для испытания мембран с размером пор 0,45 мкм применяется культура микроорганизмов *Serratia marcescens* (штамм ATCC 14756; метод ASTM D 3863), в то время как для мембран с размером пор 0,2 мкм — культура микроорганизмов *Pseudomonas diminuta* (метод ASTM D 3862), впервые выделенная и описанная Боуменом и др. [39], так как она проходит мембрану с размером пор 0,45 мкм.

Выбор *Pseudomonas diminuta* в качестве тест-бактерии для испытания мембран преследует ту же цель, что и использование очень термостойких спорообразующих бактерий *Bacillus stearothermophilus* для определения эффективности стерилизации паром. Задача состоит в том, чтобы провести испытания системы в «самых плохих» условиях.

Средние размеры бактерий *Pseudomonas diminuta* (штамм ATCC 19146, или штамм FDA PC1-818) находятся в пределах 0,3—1,0 мкм, хотя и с некоторыми отклонениями от этих значений в зависимости от тех условий, в которых находится культура. Лихи и Сулливан [133] заметили, что при определенных условиях роста микроорганизмы имеют тенденцию к образованию коагулятов в виде комков или розеток, содержащих от трех до восьми бактериальных клеток, что дает примерно пятикратное увеличение эффективных размеров частицы. Во избежание образования коагулятов, а также чтобы размеры бактерий были минимальными, очень важно дать культуре войти в максимально стационарную фазу роста (как правило, в течение 22—24 ч при температуре 30 °C) и использовать культуральную среду — солевой лактозный бульон, — которая тормозит рост бактерий *Pseudomonas diminuta*, поскольку при медленном росте размеры клеточных частиц меньше. Солевой лактозный бульон состоит из 7,6 г хлорида натрия, 30 мл лактозного бульона

(Балтиморские биологические лаборатории; 1,3 г дегидратированного порошка лактозы на 100 мл дистиллированной воды) и 970 мл дистиллированной воды. Эта среда фактически является разбавленным солевым раствором, в который добавлено ограниченное количество источника питательных для бактерий веществ (лактоза бактериями по существу не используется, поэтому ее можно исключить). В этой среде через 24 ч инкубации при температуре 30 °C развивается культура лишь со средней плотностью, и микроорганизмы, обнаруживаемые с помощью растрового электронного микроскопа, представляют собой небольшие коккобактерии (рис. 4.11, а). Напротив, те же микроорганизмы, выращенные в богатой среде, например в соево-казеиновом бульоне, оказываются значительно более крупными и чаще образуют коагуляты (рис. 4.11, б).

Испытания по методу задержки бактерий с использованием *Pseudomonas diminuta* проводятся следующим образом. Культура солевого лактозного бульона, выращенная в течение 22—24 ч при температуре 30 °C, разбавляется десятикратно 0,1 %-ной пептонной водой так, чтобы получить 100 мл суспензии. В 1 мл разбавленной суспензии будет находиться примерно 10^7 микроорганизмов. Затем всю суспензию фильтруют через стерильное фильтрующее устройство (рис. 4.12), приемная колба которого содержит 140 мл стерильного триптиказно-соевого бульона двойной крепости. Мембрана, подлежащая испытанию, находится в фильтродержателе. После того как суспензию пропустят через мембрану (общее число фильтрующихся бактерий равно 10^9), стенки приемной колбы промывают через мембрану двумя порциями по 20 мл пептонной воды. Затем сбрасывают вакуум, удаляют приемную колбу и на это место помещают стерильную каучуковую заглушку. Колбу, содержащую триптиказно-соевый бульон теперь уже нормальной крепости и некоторое количество бактерий, прошедших сквозь мембрану, инкубируют на протяжении 48 ч при температуре 37 °C, после чего тщательно проверяют на мутность. Обнаружение последней свидетельствует о возможном выходе мембраны из строя; эту замутненную жидкость подвергают микроскопическому исследованию с окраской по Граму, чтобы подтвердить, что микроорганизм представляет собой *Pseudomonas diminuta*. Неверный результат может получиться, если мембрана в фильтродержателе размещена неправильно и часть жидкости может проходить помимо мембраны в фильтрат. Чтобы проверить, не случилось ли этого, по завершении фильтрации мембрану извлекают из фильтродержателя в условиях асептики, помещают ее в чашку Петри с триптиказно-соевым агаром и инкубируют при температуре 37 °C в течение 48 ч. Затем мембрану (со стороны выхода фильтрата) проверяют на рост бактериальной культуры; если

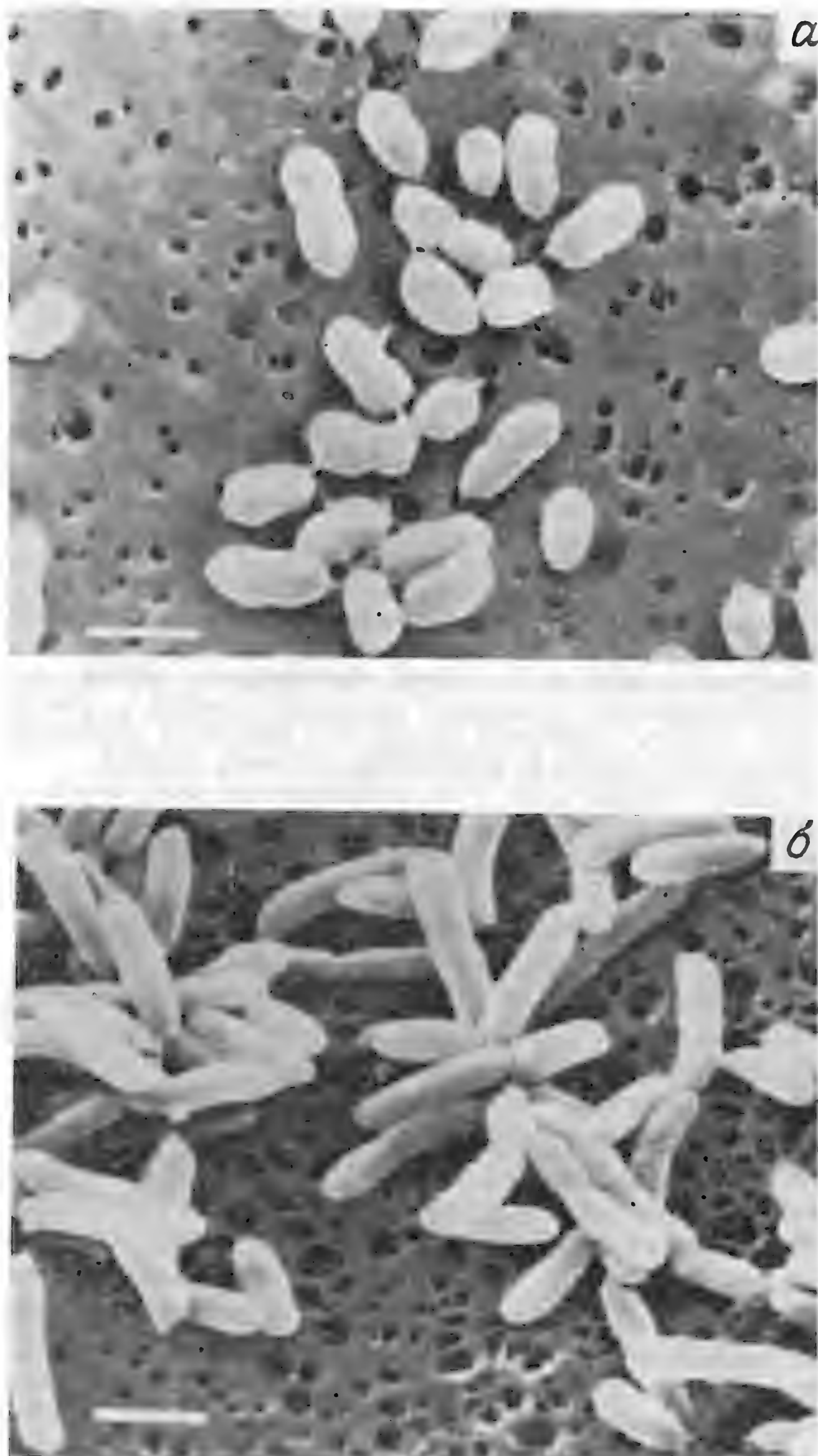


Рис. 4.11. Микрофотографии, полученные на сканирующем электронном микроскопе, бактерий *Pseudomonas diminuta* ATCC 19146, выращенных в солевом лактозном бульоне (а) и в соево-казеиновом бульоне (б). Заметна разница в размерах бактерий. На обоих рисунках масштабные метки имеют длину 1 мкм. (С разрешения Т. Лихи, фирма «Миллипор корпорейшн».)

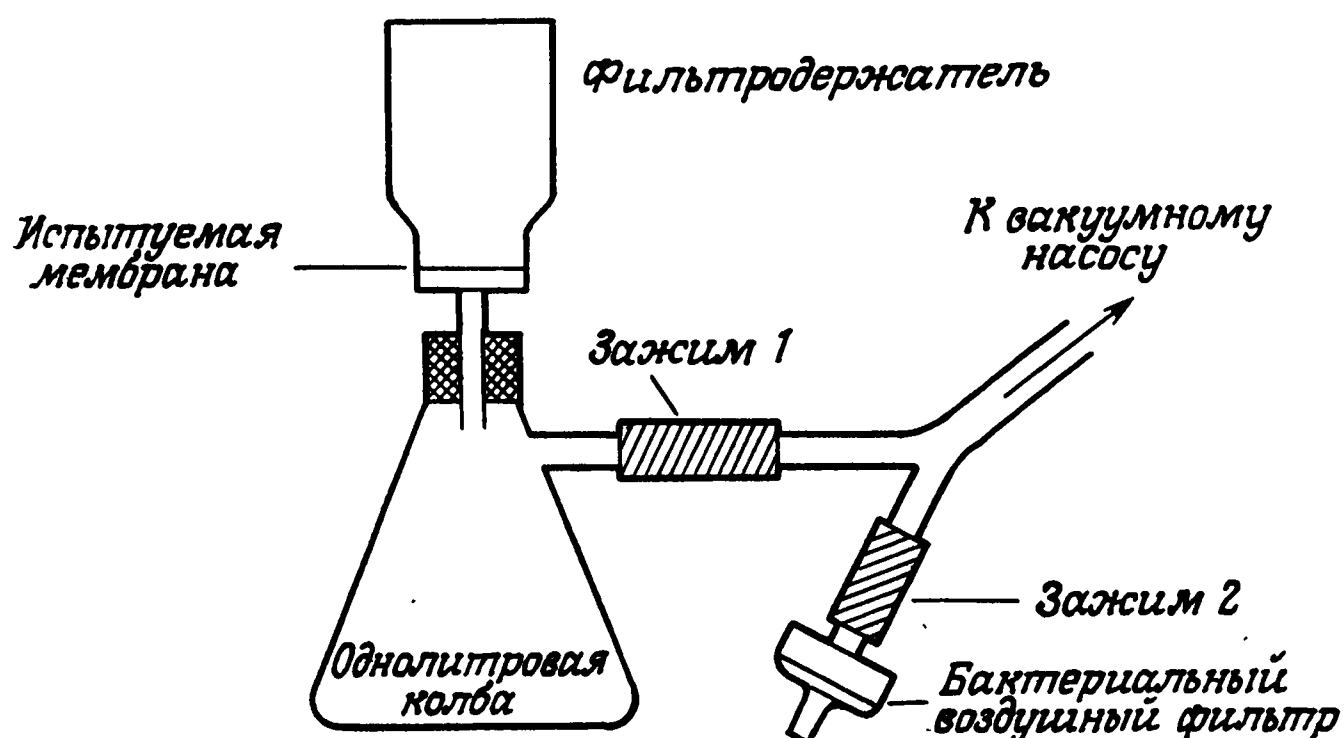


Рис. 4.12. Установка для определения задерживающих характеристик мембранных фильтров. Вся установка стерилизуется. Вначале в колбе находится 140 мл питательной среды двойной крепости. Суспензию тест-бактерий (100 мл) пропускают через мембрану при открытом зажиме 1 и закрытом зажиме 2. Части фильтродержателя и мембрану промывают двумя порциями по 20 мл стерильного бульона. Затем открывают зажим 2, сбрасывают вакуум и вновь пережимают трубку, снимают мембрану, колбу закрывают стерильной резиновой пробкой и инкубируют. Отсутствие муты в колбе указывает на то, что мембрана задерживает тест-бактерии. (По методике ASTM D 3862; авторские права ASTM.)

он происходит, то это свидетельствует о неисправности фильтрующей аппаратуры. Весь процесс повторяют снова, используя другую мембрану, стерильную аппаратуру и стерильную 0,1 %-ную пептонную воду.

Чтобы правильно оценить результаты испытаний по методу задержки бактерий, очень важно, чтобы можно было контролировать свойства культуры бактерий и управлять ими в течение этих испытаний. Это означает, что культуры бактерий следует чаще исследовать на чистоту микробиологическими и микроскопическими методами, а величину и степень агрегирования бактерий проверять фазово-контрастной микроскопией. Новые порции культуры бактерий следует периодически получать из музея культур, с тем чтобы гарантировать их генетическое постоянство. В дополнение к стандартным бактериологическим испытаниям тест-бактерий следует проводить эти испытания также и в тех условиях, в которых будет впоследствии использоваться мембрана. Для *Pseudomonas diminuta*, например, оценка агрегированности осуществляется фильтрованием бульона с культурой бактерий, выращенной, как описано выше, через стандартный мембранный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм типа Миллипор НА. Если культура удовлетворительна, бактерии должны пройти через эту мембрану, но не через мембрану с порами 0,2 мкм. Более подробно о приемах работы

с культурами бактерий см. в работе [133]. Для испытания мембран с порами диаметром 0,45 мм используют бактерии *Serratia marcescens*, применяя аналогичные приемы.

Для испытаний по описанной выше методике Американское общество по испытанию материалов (ASTM) рекомендует минимум пять случайно выбранных мембран из пяти произвольно взятых упаковок. Поскольку даже единственный микроорганизм, прошедший сквозь мембрану, может дать начало бактериальному росту, что сразу вызовет помутнение фильтрата, метод задержки бактерий имеет чрезвычайно высокую чувствительность. Для практических лабораторных испытаний вполне достаточными оказываются 100 мл фильтруемой бактериальной суспензии, содержащей 10^9 фильтруемых микроорганизмов. Однако условия проводимого испытания можно ужесточить, увеличив либо объем фильтруемого бульона, либо концентрацию суспензии тест-бактерий. В гл. 7 мы более подробно рассмотрим такие более жесткие методы испытаний мембран по задержке бактерий.

Чтобы на основании испытаний по методу задержки можно было сделать какие-то количественные оценки, Лихи и Сулливан [133] определяли число бактерий, проходящих сквозь мембрану, улавливая их на другой мембране с порами меньших размеров с последующим помещением этой последней мембраны прямо на чашку с агаром для счета микроорганизмов по числу колоний. Таким же образом можно определить и величину β , т. е. отношение числа бактерий в посеве к числу бактерий в фильтрате. Большое значение β указывает на высокую задерживающую способность мембраны. В табл. 4.2 (из работы [133]) представлены некоторые значения β для мембранных фильтров с различными размерами пор. Мы видим, что перепад давления влияет на эффективность работы мембраны — при

Таблица 4.2. Влияние давления (P) на прохождение *Pseudomonas diminuta* через мембраны с порами различных размеров (в двух правых колонках представлены значения β)

Размер пор, мкм	$P = 0,35$ атм	$P = 3,5$ атм
0,22	10*	$> 10^*$
0,45	8,6	7,6
0,65	4,6	3,1
0,80	2,0	1,3

Приведены значения β , рассчитанные как десятичный логарифм отношения числа микроорганизмов в посеве к их числу в фильтрате.

* Не зафиксировано прохождение через мембрану.

более высоких давлениях величина β меньше, т. е. большее число бактерий проходит сквозь мембрану. Следует также заметить, что на задерживающие характеристики мембраны оказывает влияние *скорость*, с которой изменяется давление на мембране. Быстрое открытие крана и как следствие быстрое нарастание давления вызывают гидравлический удар, который может способствовать проталкиванию микроорганизмов через мембрану.

Хотя рассмотренная выше процедура испытаний относится главным образом к лабораторным условиям, метод задержки бактерий применим также и к крупномасштабным промышленным, и к фармацевтическим мембранным аппаратам [159, 165]. На рис. 4.13 иллюстрируется проведение испытаний фирмой-изготовителем для определения качества мембран.

Испытания своих мембран по методу задержки бактерий проводит большинство фирм-изготовителей, но они не сообщают при этом допустимого уровня качества. Эти уровни качества, по-видимому, такие же, что и принятые в Военном стандарте США (см. разд. 4.10). Описанный выше метод ASTM пригоден для оценки эффективности лишь мембран с размерами пор 0,2

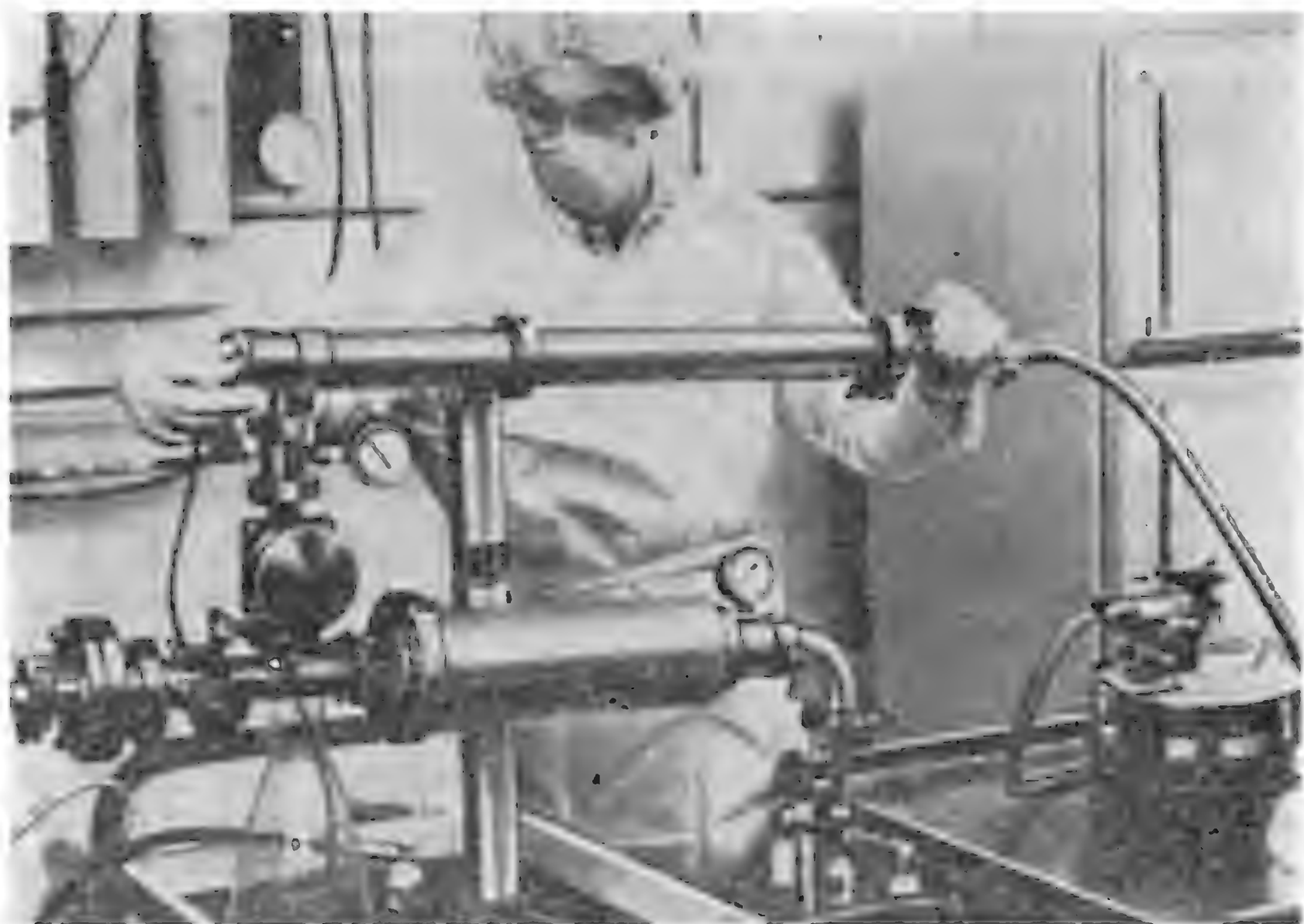


Рис. 4.13. Испытание на пропускание тест-бактерий мембранного фильтропатрона. (С разрешения фирмы «Миллипор».)

и 0,45 мкм. Фирма «Майкрофилтрейшн Системс» осуществляет проверку своих мембран с порами диаметром 0,1 мкм, используя культуру бактерий *Mycoplasma laidlawii*, клетки которых проходят сквозь поры размером 0,2 мкм. Фирма «Пол компани» испытывает свои мембраны с порами диаметром 0,1 мкм, используя один из штаммов бактерий, обнаруженных в воде и имеющих размеры в пределах 0,08—0,13 мкм. За исключением особых случаев, таких, как промышленное производство вакцин и инъекционных растворов, остается не ясным, следует ли столь трудоемкий метод испытания, как метод задержки бактерий, широко использовать на практике, за исключением изготовителей мембран, применяющих этот метод при контроле качества продукции в процессе ее производства. Целостность мембраны можно установить также и методом пузырька, описанным в разд. 4.2; этот метод позволяет осуществить неразрушающий контроль, в то время как мембрана, испытанная по методу задержки бактерий, очевидно, непригодна для дальнейшего использования.

В заключение настоящего раздела следует заметить, что испытания по методу задержки бактерий — это весьма чувствительный метод определения целостности мембран, но после испытания мембран этим методом они оказываются непригодными для дальнейшего применения. Поэтому фирмы-изготовители используют этот метод для контроля качества стерилизующих мембран на этапе изготовления и для выборочного контроля качества больших партий фильтрующего материала и готовых изделий (таких, как фильтр-патроны). Испытания по методу задержки бактерий проводятся фирмами-изготовителями также и для того, чтобы подтвердить пригодность к использованию каких-то отдельных элементов или всей фильтровальной установки в целом, а также с целью проверки всего процесса мембранной фильтрации. Как правило, потребители мембран проводят испытания один раз перед их использованием или при тех или иных изменениях технологии. Методы задержки бактерий можно сделать чрезвычайно чувствительными в зависимости главным образом от числа бактерий на мембране.

В США Ассоциацией медицинских промышленников были разработаны соответствующие технические условия с целью определения работоспособности патронных фильтров для стерилизации лекарств; рекомендации из этих технических условий широко используются фирмами-изготовителями мембран. Вот один из примеров такой рекомендации.

6000 мл культуры с содержанием 10^7 микроорганизмов (*Pseudomonas diminuta*) в 1 мл, выращенной в солевом лактозном бульоне, пропускают через фильтр-патрон. Все 6000 мл фильтрата должны быть инкубированы. В инкубированном

фильтрате не должно содержаться ни одной бактерии. Таким образом, снижение содержания бактерий фильтр-патроном превышает $6 \cdot 10^{10}$ ($\beta > 10,8$).

4.7. СОДЕРЖАНИЕ ЭКСТРАГИРУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ И ЗОЛЫ В МЕМБРАНАХ

Мембраны содержат в малых количествах растворимые в воде вещества. В отдельных случаях фильтрации эти экстрагируемые вещества, переходящие в фильтрат, могут приводить к некоторым трудностям. Наиболее часто встречающимися из экстрагируемых веществ в мембранах являются смачивающие агенты, добавляемые к материалу мембраны в процессе ее изготовления для того, чтобы сделать ее гидрофильной, повысить гибкость и улучшить свойства, связанные с ее обслуживанием [44]. Если не использовать эти вещества, мембрана может не смачиваться фильтруемым раствором, а это ведет к ухудшению параметров процесса мембранной фильтрации. Смачивание мембран особенно существенно в процессах крупномасштабной промышленной фильтрации, поскольку при этом значительно снижаются временные затраты. Мы уже отмечали в разд. 4.2, что метод точки пузырька не позволяет провести испытания, если мембрана не будет смоченной соответствующим образом. Примерами широко используемых смачивающих агентов могут служить глицерин, Твин-80, Тритон X-100, Ключель-J и гидроксипропилцеллюлоза.

При изучении состава отливочных растворов, применяемых для приготовления мембран (см. гл. 3), становится очевидным, что материал мембраны должен содержать незначительные количества самых различных веществ, попадающих в мембрану из исходных материалов, используемых в процессе производства мембраны. Кроме того, сама целлюлоза, будучи природным продуктом, какой бы чистоты она ни была, содержит в себе примеси. Экстрагируемыми из материала мембраны веществами могут быть такие неорганические компоненты, как металлы, хлориды и фосфаты. Поэтому всегда необходимо учитывать те последствия, которые могут возникнуть из-за перехода в фильтрат каких-либо из указанных выше веществ.

Если мембранные фильтры используются главным образом при проведении бактериологических исследований воды улавливанием микроорганизмов на поверхности мембраны, фильтрат обычно выбрасывают. Поэтому значительная часть проблем, связанных с наличием примесей, снимается при фильтрации больших количеств воды. Эти проблемы, как правило, отсутствуют и при культивировании мембраны с задержанными ею

бактериями. Однако если нам нужно получить стерильный фильтрат, например в случае фильтрации при приготовлении лекарственных средств или культуральных сред, или если через мембрану пропускают небольшие количества воды, то в этих случаях экстрагируемые примеси должны стать объектом специального рассмотрения.

На рис. 4.14 представлены типичные кривые экстракции глицерина и поверхностно-активных веществ при их фильтрации через мембрану. Количество экстрагируемых веществ из мембраны водой данного объема зависит, конечно, от массы мембраны; поэтому для повышения чувствительности метода следует использовать мембрану большого диаметра. Кестинг и др. [124] указывают, что в случае глицерина примерно 90 % вещества экстрагируется первыми 50 мл воды, проходящей через мембрану большого диаметра (293 мм), а 95 % — следующими 50 мл. В противоположность глицерину поверхностно-активные вещества связаны более сильно, поэтому для их удаления из материала мембраны требуется более интенсивная промывка.

Определить общее количество экстрагируемых веществ можно по методу ASTM D 3861, который был также принят для использования Американским агентством по защите окружающей среды [34]. Экстрагируемые водой вещества определяются по потере массы мембраны после экстракции веществ кипящей водой. Поскольку метод основан на измерении небольшой разницы массы мембраны до и после экстракции, имеется потенциальная возможность совершить очень большую ошибку. Поэтому для уменьшения ошибки такие измерения следует проводить для серии мембран. Большое внимание необходимо уделить и тому, чтобы не произошло изменения массы мембран из-за поглощения влаги из воздуха. Для исключения ошибок взвешивания, обусловленных изменениями баланса весов или содержанием влаги в атмосфере при взвешивании, используют серию контрольных мембран, прошедших всю процедуру взвешивания, за исключением стадии экстракции.

Для проведения анализа экстрагируемых веществ испытуемую и контрольную мембраны сначала нагревают в термостате при температуре 70 °C в течение 15 мин для удаления влаги; затем их помещают для охлаждения на 30 мин в эксикатор и выдерживают 10—15 мин в атмосфере помещения, в котором проводится взвешивание. При этом влажность атмосферы помещения для взвешивания должна контролироваться. Сначала определяются исходные массы как испытуемых, так и контрольных мембран, причем массы этих мембран диаметром 47 мм должны различаться не более чем на 0,1 мг. Контрольные мембраны помещают в эксикатор, а испытуемые экстрагируют в течение 30 мин кипящей водой. В 200 мл кипящей

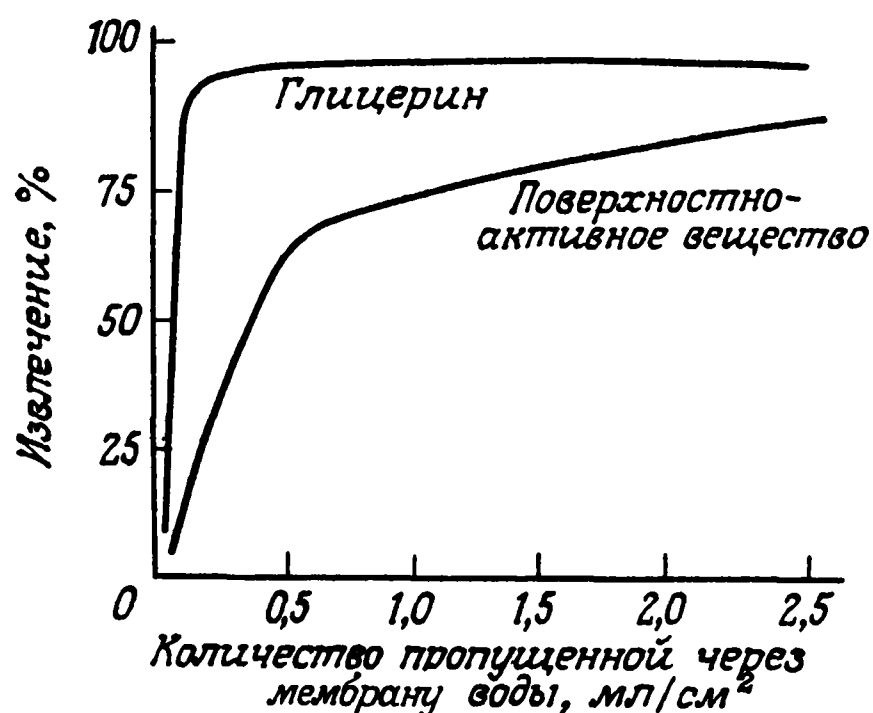


Рис. 4.14. Экстракция смачивающих мембрану агентов последовательной промывкой водой. Большинство типов мембран содержит поверхностно-активные вещества типа Твин-80 или Тритон X-100. Часто к мембране, используемой в патронном варианте, добавляют глицерин, чтобы сделать ее более эластичной при складывании. Сведения о применении глицерина заимствованы из работы [124], а о поверхностно-активных веществах — из технической документации фирмы «Пол корпорейшн».

воды можно обработать до четырех отдельных мембран диаметром 47 мм. Затем мембраны аккуратно извлекают из воды, размещают их на чистых стеклянных пластинах и дают им подсохнуть при температуре 70 °С в течение 60 мин. После этого их помещают в эксикатор на 30 мин (в ходе экстракции и сушки возможны различные повреждения мембран). Наконец, как испытуемые, так и контрольные мембраны выдерживают в помещении для взвешивания в течение 10—15 мин и потом взвешивают с точностью до 0,1 мг. Содержание экстрагируемых веществ (в процентах) рассчитывают по следующей формуле:

$$E = \frac{(W_1 - W_2) + (W_4 - W_3)}{W_1} \cdot 100,$$

где E — содержание экстрагируемых веществ в процентах, W_1 — исходная масса испытуемой мембраны, W_2 — окончательная масса испытуемой мембраны, W_3 — исходная масса контрольной мембраны и W_4 — окончательная масса контрольной мембраны.

Для исследования мембраны на содержание в ней конкретных экстрагируемых компонентов ее погружают в дистиллированную воду высокого качества на 24 ч, а затем проверяют, нет ли в экстракте интересующих соединений. К числу последних относятся, например, ионы металлов, углерод органических соединений, фосфор, аммиак и др. [34].

При использовании мембранных фильтров для бактериологического исследования воды вещества, выщелачиваемые из мембраны, могут вызывать рост бактерий или задерживать его, что является возможным источником ошибочных результатов [38]. Чтобы выяснить способности мембраны вызывать рост бактерий или тормозить его, необходимо проведение различ-

ного рода исследований экстрагируемых веществ [81]. Для этого вначале мембрану выдерживают в дважды дистиллированной или иным путем тщательно очищенной воде. Объем воды, в которой выдерживают мембрану, должен быть равным тому количеству, которое применяется при самом анализе. Как предписывает Американская ассоциация здравоохранения [2], эта вода должна быть затем исследована на пригодность следующим методом. Исследуют рост чистой культуры бактерий *Enterobacter aerogenes* в питательной среде, которую готовят с использованием взятой после экстрагирования мембраны воды. После 24-часового периода роста определяют плотность популяции бактерий путем подсчета числа жизнеспособных микроорганизмов. Если присутствует токсический агент или вещество, способствующее росту микроорганизмов, популяция будет примерно на 20 % и более ниже или выше контрольной.

Фирмы-изготовители, как правило, дают некоторую информацию относительно количества экстрагируемых веществ в их мембранах. Согласно Олсону [159], содержание экстрагируемых веществ для большинства мембран, полученных методом отливки, оценивается как 900 мг на 1 м² поверхности. Среди стандартных мембранных фильтров самое низкое содержание экстрагируемых веществ имеют фильтры фирмы «Сарториус». Согласно документации этой фирмы, масса экстрагируемых веществ в ее мембранах составляет около 0,6 % массы самой мембраны из нитро- или ацетилцеллюлозы. Фирма «Миллипор» сообщает, что содержание экстрагируемых веществ в ее мембранах порядка 5 % и меньше, однако не приводит по этому поводу никаких подробностей. Для фильтрования биологических веществ эта фирма поставляет на продажу серию мембран из эфира целлюлозы с низким содержанием экстрагируемых водной фазой веществ (мембраны марки TF). Мембраны фирмы «Шляйхер и Шуль» из нитроцеллюлозы содержат порядка 1,5 % экстрагируемых веществ. «Гелман компани» приводит конкретные данные по содержанию экстрагируемых веществ для каждого типа выпускаемых ею мембран:

Тип мембраны	Содержание экстрагируемых веществ
GA (ацетилцеллюлоза)	<3 %
TSM (ацетилцеллюлоза)	<1 %
GN (смесь эфиров целлюлозы)	<2 %
Альфа (регенерированная целлюлоза)	<15 %
Винил (поливинилхлорид)	<6 %
TF (тефлон)	Следы

Фирма «Пол компани» изготавливает серию нейлоновых гидрофильных мембран, не требующих в силу этого добавки смачивающего агента. В этих мембранах содержится очень

мало экстрагируемых водой веществ, главным образом полимеров найлона низкой молекулярной массы. При экстрагировании водой или этанолом содержание экстрагируемых веществ в фильтр-патронах фирмы «Пол компани» лежит в пределах 300—400 нг/см². После автоклавирования содержание веществ, экстрагируемых водой, удваивается, а экстрагируемых этанолом увеличивается в 5 раз, но это все еще достаточно низкие показатели.

По данным фирмы «Нуклепор» выпускаемые этой фирмой трековые мембраны из поликарбоната не содержат поверхностно-активных веществ или не требуют добавки смачивающих агентов, однако каких-либо данных о наличии экстрагируемых водой веществ не сообщается.

Мембраны фирмы «Майкрофилтрейшн системс» (MFS) экстрагируют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 30 мин, после чего экстракт исследуют на спектрофотометре в ультрафиолетовой области и анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а для определения общего содержания органических веществ используют титрование перманганатом. Однако каких-либо сообщений о том, как ведут себя мембраны при этих испытаниях, не имеется.

Следует заметить, что экстрагируемые вещества могут, по-видимому, образовываться в небольших количествах и при автоклавировании; поэтому, если мембрану предполагается использовать после автоклавирования, ее необходимо обработать соответствующим образом. Правильным было бы автоклавирование мембран в соответствующих ее эксплуатации условиях с последующим количественным анализом экстрагируемого материала.

Как правило, мембранные фильтры содержат также небольшие количества мелкодисперсной пыли или частиц, прилипших к мембране при ее изготовлении вследствие электростатического притяжения частиц из окружающей среды. Эти частицы не входят в саму матрицу мембраны и обычно прилипают к поверхности слабо. Их можно удалить с нижней стороны мембраны промывкой соответствующей жидкостью перед началом процесса фильтрации. В большинстве применений эти мелкие частицы не приводят к каким-либо осложнениям, однако в особо ответственных случаях, например при подкожных инъекциях человеку, их необходимо удалять.

Следует также заметить, что не все загрязнения попадают в фильтрат с мембраны. Корпус фильтродержателя и связанные с ним другие части фильтровальной установки могут быть источниками растворимых в фильтруемой среде веществ. Поэтому в ответственных случаях необходимо проводить испыта-

ния с целью установить, какой вклад в загрязнение вносит вся фильтровальная установка.

Следует упомянуть также о загрязнениях, вызываемых стекловолоконными глубинными фильтрами, поскольку последние обычно используются совместно с мембранными фильтрами или вместо них. Стекловолоконные фильтры не содержат совсем смачивающих агентов или других органических веществ, но содержат значительное количество неорганических материалов. В боросиликатное стекло, из которого они изготавливаются, входят натрий, калий, кальций, магний, цинк и легко растворимые в воде катионы. По данным фирмы «Ватман компани» ее фильтры из стекловолокна за относительно

Таблица 4.3. Содержание различных химических элементов в мембранных фильтрах (в частях на миллион)

Химический элемент	Метрисел GN (фирма «Гелман»)	MF-NA (фирма «Миллипор»)	Нитроцеллюлоза (фирма «Шляйхер и Шуль»)	Полисульфон (фирма «Гелман»)
Алюминий		2,8	13	
Барий		0,2	0,5	
Железо	3,1	5,9	1,0	4,6
Кадмий			0,3	
Кальций		60,2	6,0	
Кобальт	0,31	0,02		
Кремний		18,5	10,0	
Литий		0,01	0,1	
Магний		17,0	15,0	
Марганец	1,24	0,51	0,1	1,93
Медь	0,31	4,8	0,1	1,93
Молибден		0,08	0,03	
Мышьяк			0,1	
Натрий		77,7	150,0	
Никель	0,31	0,34		1,93
Олово	0,62			0,29
Ртуть			0,003	
Свинец	0,62	0,35	0,1	0,29
Сера		9,0	9,0	
Серебро		77,7	150,0	
Стронций		0,43	0,2	
Сурьма				0,22
Титан		0,09	0,09	
Фосфор		19,1		
Хром	0,62	3,1	0,03	0,22
Цинк	0,31	3,15	0,03	1,93

Данные заимствованы из литературы [85, 209], а также из технической документации фирмы «Шляйхер и Шуль». Представленные числовые значения получены лишь для конкретной партии испытанных мембран, и, следовательно, их можно рассматривать в качестве ориентировочных для ожидаемого диапазона концентраций соответствующих элементов.

короткий период экстракции при комнатной температуре или при 100 °С выделяют все эти элементы в больших количествах. Например, при диспергировании 5 г предварительно промытой стекловолоконной бумаги в 200 мл дистиллированной воды с последующим выдерживанием при температуре 27 °С в течение 24 ч выделяется в раствор (в частях на миллион): катионов натрия — 1710, калия — 30, кальция — 26, магния — 0,8, цинка — 9.

В тех случаях, когда экстрагируемые вещества могут вызывать осложнения при фильтрации, их можно удалить предварительной обработкой мембраны. Однако удаление при этом увлажняющего агента делает мембрану хрупкой. Кроме того, высушенная экстрагированная мембрана может опять стать несмачиваемой; поэтому такие мембраны должны использоваться сразу же после экстрагирования.

Если имеется необходимость проанализировать те или иные вещества, удержанные мембраной, то нужно знать, каково **содержание золы** в ней. Как правило, количество различных неорганических соединений в мембранах, сделанных из эфиров целлюлозы, очень незначительно, однако может понадобиться определение их количества в качестве меры «фона». Некоторые данные по содержанию золы в различных типах мембранных фильтров приведены в табл. 4.3. В отдельных важных случаях при использовании мембран необходимо содержание присутствующих в мембране химических элементов, представляющих интерес.

4.8. ТОКСИЧНОСТЬ ПРИМЕСЕЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В МЕМБРАНАХ

В предыдущем разделе мы обсудили характер водорастворимых загрязнений в мембранах и описали некоторые простые способы их количественного анализа. В фармацевтической промышленности и медицине мембраны зачастую используются с целью получения стерильных лекарственных растворов для инъекций. В этом случае необходимо проводить значительно более строгий контроль качества экстрагируемых веществ. Соответствующий метод контроля подробно рассматривается Олсоном в работе [159]. В дополнение к определению процентного содержания экстрагируемых веществ в мембранах необходимо также проведение некоторых специальных анализов. Одним из важных испытаний, которое нужно проводить обязательно, является проверка изделий из полимеров на токсичность так, как это описывается в Фармакопее США (USP) [228]. USP предлагает несколько различных тестов для такой проверки в зависимости от температуры, при которой идет экстрагирование из

полимерных материалов. Что касается мембранных фильтров, то их следует проверять после первой стерилизации мембран таким же образом, как и в условиях реальной эксплуатации. Количество экстрагируемого материала определяется площадью поверхности, подвергаемой действию экстрагента; в случае тестов USP эта площадь равна 120 см² (учитываются обе стороны мембраны). Образец мембраны разрезают на несколько небольших частей, помещают их в 20 мл физиологического раствора и проводят экстрагирование при температурах 50 или 70 °С в течение 24 ч. Экстракт используют затем для внутривенных инъекций 5 белым мышам из расчета 50 мл на 1 кг массы. За состоянием подопытного животного начинают наблюдать сразу после инъекции и через 4, 24, 48 и 72 ч определяют степень его отравления, а в случае летального исхода констатируют смерть. Мембрану можно считать удовлетворяющей требованиям стандарта USP, если ни одно из подопытных животных не проявляет признаков отравления. Кроме того, для проверки токсичности используется метод, когда подопытным животным вводится экстрагирующий физиологический раствор сразу же после его контакта с материалом мембраны без предварительного выдерживания. Стандарт USP предусматривает также подкожное введение различных жидкостей кроликам для установления веществ, вызывающих кожные реакции.

Имеются также и более чувствительные тесты для проверки мембран на токсичность с помощью клеточных культур. В ходе этих испытаний экстракт мембранного материала используют при выращивании культуры клеток легких человеческого эмбриона (штамм W1-38 [236]). Вместо физиологического раствора здесь при экстракции применяют питательные культурные среды; экстрагирование проводят в стерильных условиях при температуре 36 °С в течение 24 ч, а полученный экстракт используют как среду для выращивания культуры клеток. По прошествии 24-часового периода инкубации с помощью микроскопического исследования этих культур клеток определяют токсичность экстракта; при проведении соответствующих контрольных наблюдений в культурах не должно быть каких-либо видимых изменений.

В дополнение к испытаниям на токсичность определяют пирогенность экстракта, т. е. проверяют, может ли у подопытных животных подняться температура при его инъекции. Среди стандартных методов проверки на пирогенность, предписываемых USP, очень чувствительным является метод, использующий лизат бактерий *Limulus* и позволяющий обнаружить присутствие бактериальных эндотоксинов. Фирмы «Ватман» и «Майкрофилтрейшн системс» сообщают, что в их мембранах эндотоксины составляют менее 0,025 нг на 1 см² поверхности

мембраны (это установлено на основе использования стандартного бактериального эндотоксинного препарата, полученного в Американском управлении пищевых продуктов и лекарственных средств).

4.9. ИСПЫТАНИЯ МЕМБРАН, ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

Для того чтобы быть уверенным в том, что мембранные фильтры изготовлены правильно и пригодны для тех или иных целей, их необходимо подвергнуть специальным испытаниям. Хотя физические свойства мембран и установленные для них стандарты дают точные и воспроизводимые способы определения отклонений от нормы, они не дают нам возможности определить многие весьма тонкие изменения, происходящие в мембране, которые играют важную роль при использовании мембранных фильтров в биологических целях. Поскольку одним из главных применений мембранных фильтров является бактериологический анализ качества воды, когда результаты испытаний носят характер юридического документа, необходимо знать, как могут измениться параметры мембраны в реальных условиях ее применения. Это исключительно сложная область исследований, и в настоящем разделе мы рассмотрим лишь одну небольшую ее часть. В гл. 10 мы обсудим более подробно методы анализа качества воды.

Стандартный метод оценки мембранных фильтров при их использовании для очистки канализационных стоков, содержащих фекальные кишечные палочки (ФКП), описан в американском стандарте ASTM D 3508. Этот метод по существу состоит в сравнении числа ФКП, полученного из данной пробы сточных вод с использованием, с одной стороны, мембранной фильтрации и, с другой стороны, стандартного подсчета по методу высевания на чашки. Установлено, что этот метод применим для оценки любой мембраны, используемой в целях анализа канализационных стоков; этот же метод можно в принципе применить для многих других испытаний. При проведении данного испытания берутся пять различных необработанных проб воды (четыре из них — пробы искусственно загрязненной воды и одна — проба сточной воды), разбавляют их, если необходимо уменьшить число ФКП до требуемого уровня, и фильтруют через испытываемые мембранные фильтры, причем каждую пробу фильтруют пять раз. Мембраны культивируют в стандартной среде, используемой для анализа на ФКП (агар М-FC; температура инкубации 44,5 °C; время инкубации 22—

24 ч). Одновременно пробы нефильтрованной воды разливают на чашки с той же стандартной средой и инкубируют в тех же условиях. Голубые колонии, являющиеся признаком ФКП, подсчитывают как на мембранах, так и на чашках. Затем вычисляют среднее арифметическое из подсчетов, полученных в пяти повторных испытаниях; для каждой пробы количество извлеченного материала в процентах вычисляют путем деления числа колоний на мембранном фильтре на число колоний на чашке и умножением результата деления на 100. Необходимо также провести выборочный контроль колоний как на мембранах, так и на чашках, чтобы подтвердить, что извлеченный материал представляет собой именно ФКП (метод ASTM требует, чтобы проверялось по 20 колоний для каждого из двух фильтров и двух чашек). Это существенно, поскольку приходится иметь дело не с чистой бактериальной культурой, а с большим числом разнообразных видов бактерий в сточной воде. Следует заметить, что такой тест, хотя и представляется достаточно разумным с практической точки зрения, не позволяет проверить саму мембрану, поскольку он предполагает, что условия роста колоний в чашке полностью те же, что и в мембране, в то время как там могут иметь место некоторые различия. В самом деле, при тех же условиях и с теми же пробами сточной воды может оказаться даже, что число колоний на мембране больше, чем на чашках. Более подробно этот метод описывается в стандарте ASTM D 3508. В разд. 10.5 и 10.6 мы рассмотрим некоторые трудности, возникающие в связи с применением мембранных фильтров для определения ФКП.

Испытания, основанные на подсчете ФКП, приобретают еще большее практическое значение, когда для очистки сточных вод их подвергают «стрессу» (например, хлорированию или другой обработке). В этих случаях тест ASTM обычно нельзя использовать, поскольку в пробах, подвергнутых стрессу, бактерий слишком мало, чтобы их можно было адекватно подсчитать в условиях метода высева на чашках. В таких условиях лишь мембранная фильтрация обеспечивает достаточную чувствительность; поэтому исследователи стали на путь сравнения между собой результатов, полученных с использованием различных мембранных фильтров [35, 198]. Несмотря на то, что такие испытания и показывают, что какой-то определенный тип мембран по сравнению с другим извлекает микроорганизмы с более высокой эффективностью, возникает ряд трудностей, связанных с определением статистической значимости таких сравнений. Кроме того, следует заметить, что такого рода испытания не приводят к однозначной оценке мембранного фильтра, поскольку при подсчетах бактерий группы кишечных палочек (БГКП) или в иных подобных случаях боль-

шинство культуральных сред выбирают таким образом, чтобы достигнуть максимального извлечения бактерий при применении определенного типа мембранного фильтра [47]. В гл. 10 эти биологические тесты рассматриваются более подробно применительно к анализу загрязнений воды.

4.10. ГОСУДАРСТВЕННЫЕ СТАНДАРТЫ США НА МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ

Правительство США издает подробные технические условия на большое число мембран, которые используются различными правительственными учреждениями. Это является положительным фактором для всех потребителей, поскольку фирмы-производители обычно пытаются изготавливать мембраны в соответствии с правительственными техническими условиями. Предварительные Государственные технические условия на мембранные фильтры с размерами пор 0,01—8,0 мкм NNN-D-00370 вступили в действие 13 апреля 1965 г. Этот стандарт был заменен менее подробными техническими условиями на мембраны с размером пор лишь 0,45 мкм, которые под названием Military Specification MIL-D-37005A, Disk, Filtering, Microporous разработаны Министерством обороны США и опубликованы Центром информации ВМС США. В этих технических условиях перечислены требования к мембранным фильтрам как в отношении их изготовления, так и рабочих характеристик. При изготовлении мембраны следует учитывать требования к толщине, пористости, показателю преломления и нанесению разметочной сетки. Требования к рабочим характеристикам включают такие параметры, как точка пузырька, удельная производительность, задержка микроорганизмов, диффузионная проницаемость и бактериальная токсичность. Оговаривается также требование по выдерживанию мембраной автоклавирувания.

Для мембраны с диаметром пор 0,45 мкм эти Государственные технические условия сводятся к следующему:

1. *Относительная пористость* (в процентах) определяется путем измерения объема и массы мембраны, а также путем теоретического расчета массы твердого диска, имеющего ту же плотность и те же размеры (толщину и диаметр), что и мембрана. Пористость равна умноженному на 100 частному от деления разности теоретической массы твердого диска и фактической массы мембраны на теоретическую массу твердого диска. Пористость должна быть не менее 77 %.

2. *Показатель преломления* определяется с помощью стандартной микроскопии с применением иммерсионных жидкостей с разной преломляющей способностью. Пока-

затель преломления должен быть равным $1,51 \pm 0,01$ (заметим, что это значение имеют лишь мембраны из эфира целлюлозы).

3. *Точку пузырька* находят по методу ASTM F 316, описанному выше в этой главе, причем испытуемой жидкостью является вода. Точка пузырька должна быть равной $2,24 \pm 0,14$ кг/см².

4. *Удельная производительность* (скорость потока воды) определяется на установках с мембранами в форме дисков диаметром 47 мм при температуре 25 °С и перепаде давления 700 мм рт. ст. Эта величина должна составлять 55 мл/(мин $\times$ $\times$ см²).

5. *Задержка микроорганизмов* измеряется по методу, описанному выше в настоящей главе, с использованием штамма *Serratia marcescens*. Суспензия в физиологическом растворе или в фосфатном буфере объемом 100 мл с содержанием в 1 мл 10^3 микроорганизмов пропускается через стерилизующую испытуемую мембрану, после чего фильтрат собирают с соблюдением правил асептики. Затем фильтрат пропускают через контрольную мембрану (мембрану сравнения) с теми же размерами пор, после чего эту мембрану помещают в агаровую среду (пептонный агар Уилсона). Отсутствие колоний бактерий на контрольной мембране указывает на стерильность фильтрата и на эффективность задержки микроорганизмов испытуемой мембраной. (Потребители мембран должны обратить внимание на то, что в технических условиях министерства обороны «Military Specification» ошибочно не указаны требования к объему фильтруемой культуры, однако в прежних технических условиях, которые были отменены, указывался объем 100 мл, и этого объема все еще придерживаются фирмы-изготовители.)

6. *Диффузионная проницаемость* определяется следующим образом. Плоскую мембрану помещают на чистую поверхность воды и измеряют время ее смачивания. После того как мембрана смочилась, проверяют, нет ли несмоченных участков. Обычно мембрана смачивается равномерно за 15 с.

7. *Испытание на бактериологическую токсичность* предусматривает использование фосфатно-буферной суспензии культуры бактерий *E. coli*, содержащей 30—80 жизнеспособных микроорганизмов в 0,1 мл. Подсчет жизнеспособных микроорганизмов проводят параллельно с использованием как мембраны, так и разливания на чашках. Для проведения исследований с помощью мембраны стерильный буферный раствор объемом 20 мл помещают в воронку над мембраной, а потом добавляют в нее 0,1 мл культуры и полученную суспензию фильтруют. Приготавливают 5 чашек без мембран и 5 чашек с мембранами в виде дисков; последние считаются нетоксичными, если в чашках с мембранами сохраняется по крайней

мере 90 % количества микроорганизмов, найденного по подсчетам колоний на чашках без мембран.

8. Для испытаний на *устойчивость к автоклавированию* мембрану помещают в автоклав в специальной защитной упаковке и выдерживают в течение 10 мин при температуре 121 °C, после чего проверяют, не произошло ли ее растрескивания или изменения размеров.

Государственные технические условия включают в себя также акт технического приема (Quality Assurance protocol). В этом акте должны быть отражены уровень проверки мембран и процентное содержание допустимых дефектов. Уровень проверки обуславливает процентную долю мембран в каждой партии, которая подлежит испытаниям, а такой показатель, как допустимый уровень качества, определяет процент допустимых дефектов. Для получения указанных выше параметров мембран из каждой партии должен подвергнуться испытанию 1 % мембран, а допустимый уровень качества должен быть равен нулю. Если обнаружится один дефектный экземпляр, проверке подлежит другая группа мембран из той же партии. Если при второй проверке дефектного экземпляра не окажется, то всю партию пропускают; если же при второй проверке вновь обнаружится один или более дефектных экземпляров, то вся партия выбраковывается. Испытуемые экземпляры из партии выбираются произвольным образом.

Одно замечание, которое следует сделать по поводу этих Государственных технических условий,— это то, что они относятся лишь к мембранным фильтрам для бактериологического анализа воды. Технические же условия на мембраны, предназначенные для стерилизации фармацевтических средств и других продуктов, оказываются совсем иными. Эти технические условия мы рассмотрим в гл. 7.

Несмотря на то что технические условия на мембраны с другими размерами пор, приведенные в Государственном стандарте NNN-DT-00370 от 13 апреля 1965 г., были отменены, лишь из них можно почерпнуть информацию о свойствах мембранных фильтров из эфира целлюлозы с размерами пор, отличными от 0,45 мкм. Они служат, безусловно, руководством для фирм-изготовителей, и, следовательно, представляют интерес для потребителей. Поскольку копии этих технических условий нельзя больше получить от правительства США, в табл. 4.4 мы привели выдержки из них.

Большое число организаций публикует стандарты или стандартные методы оценки мембранных фильтров [52]:

- NCCLS — Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам;
 USP — Фармакопея США;
 ISO — Организация международных стандартов;
 US-EPA — Агентство по защите окружающей среды США;
 DMSC — Агентство по заготовкам медикаментов для вооруженных сил США; Центр по снабжению медикаментами министерства обороны;
 APHA — Американская ассоциация здравоохранения;
 AWWA — Американская Ассоциация водоснабжения.

Таблица 4.4. Временные государственные технические условия на мембранные фильтры с различными размерами пор

Номиналь- ный размер пор, мкм	Толщина, мкм	Пористость, %	Показатель преломления	Макс. содер- жание эк- страг. ве- ществ, %	Точка пугы- рья, атм	Удельная произв. (ско- рость потока воды) ¹⁾	Скорость потока воз- духа ²⁾
8,0	130	74	1,51	6,0	0,28±0,07	850±225	—
5,0	130	84	1,51	6,0	0,49±0,07	540±85	—
3,0	150	83	1,51	6,0	0,77±0,07	400±50	—
1,2	150	82	1,51	5,0	0,84±0,07	300±40	—
0,8	150	82	1,51	4,0	1,12±0,14	212±28	—
0,65	150	81	1,51	3,0	1,47±0,14	150±14	—
0,45	150	79	1,51	2,5	2,24±0,14	64±9	—
0,30	150	77	1,51	2,0	2,80±0,35	40±10	—
0,22	135	75	1,51	2,0	3,85±0,35	21±3	—
0,10	130	74	1,50	1,5	7,00±0,70	—	0,49±0,12
0,05	130	72	1,50	1,5	10,50±0,70	—	0,31±0,05
0,01	130	70	1,50	1,5	14,00±0,70	—	0,22±0,04

Настоящая таблица заимствована из Временных государственных технических условий NNN-D-00370 от 13 апреля 1965 г., которые впоследствии были отменены. Приведенные данные представляют собой параметры мембран из эфира целлюлозы. В настоящее время в США нет других Государственных технических условий, кроме как на мембраны с диаметром пор 0,45 мкм. Наряду с количественными характеристиками, представленными в таблице, микробиологические испытания также были стандартизованы для мембран с разными размерами пор, например для мембраны диаметром 1,2 мкм с культурой *Saccharomyces cerevisiae*, диаметром 0,65 мкм с культурой *Bacillus subtilis* var. *globigii*, диаметром 0,45 мкм с культурой *Serratia marcescens* и диаметром 0,22 мкм с культурой *Vibrio percolans*. Большинство из перечисленных микроорганизмов до сих пор используется некоторыми фирмами-производителями в испытаниях на прохождение через мембраны, за исключением культуры *Vibrio percolans*, вместо которой теперь используют *Pseudomonas diminuta*.

¹⁾ В оригинале размерность не указана; по-видимому, это мл (мин·см²·атм). — Прим. ред

²⁾ В оригинале размерность не указана; по-видимому, это л/ (мин·см²·атм). — Прим. ред.

4.11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей главе мы познакомили читателя с различными методами и испытаниями, используемыми для определения параметров и стандартизации мембранных фильтров. Хотя большую часть этих испытаний обязаны проводить только фирмы-изготовители, потребителям мембранных фильтров немало-

важно знать о них. В отдельных случаях потребители могут найти полезным провести самим некоторые из этих испытаний. Наиболее важными среди них являются определения точки пузырька и испытания мембран на задержку бактерий. Эти испытания следует проводить фармацевтическим фирмам, а также другим организациям, которые производят стерильную продукцию с применением мембранной фильтрации (см. гл. 7). Испытания по задержке бактерий не являются рутинными; их проводят лишь при пуске новой фильтровальной установки. Испытания по методу пузырька (или диффузионный тест) следует проводить всякий раз, когда устанавливается новая стерилизующая мембрана. Тест с использованием бактерий должен осуществляться лабораториями, занимающимися подсчетом БГКП, либо как периодическая проверка качества фильтровальной установки, либо для оценки новых мембран, либо в случае каких-либо изменений при проведении испытаний. Этот тест играет особенно важную роль, когда результаты анализа с помощью мембранных фильтров должны использоваться в правовых или законодательных целях (например, в случае определения качества воды, рассматриваемого в гл. 10).

Необходимо подчеркнуть одно важное обстоятельство, касающееся размеров пор мембран, которое нуждается в том, чтобы на него обратить внимание. При оценке мембран нередко принимают необоснованное допущение, что задержка частиц на мембранах происходит главным образом по ситовому механизму. Как мы уже упоминали в гл. 2 и будем говорить об этом в гл. 7 и 12, имеются основания полагать, что мембранная фильтрация осуществляется за счет адсорбции, а не ситового механизма. В литературе существует некоторое разногласие по поводу того, насколько важной для задержки частиц является адсорбция (см., например, работы [144, 177, 197]). Это представляет для нас определенный интерес в том смысле, что если адсорбция ответственна за задержку частиц, то полезность таких физических методов, как метод пузырька, оказывается несколько сомнительной. Однако с практической точки зрения ключевым моментом является не то, определяются ли размеры пор сита методом пузырька и, таким образом, минимальный размер задерживаемых частиц, а то, коррелированы ли между собой степень задержки частиц определенного размера и данные измерения точки пузырька. В работе [177] сравнением метода задержки бактерий с определением значения точки пузырька четко показано, что такая строгая корреляция существует. Большие значения давления в точке пузырька соответствуют задержке мелких частиц. Для тех, кто использует мембраны, такая связь точки пузырька с размерами частиц представляет определенный интерес.

Глава 5

Производители мембранных фильтров

Мембранные фильтры и сопутствующие им устройства, в том числе и используемые для их эксплуатации, изготавливает большое число фирм. В конце книги мы даем подробные сведения фирм-изготовителей о материалах мембран, где одновременно можно найти как соответствующую ссылку, так и подходящую мембрану для конкретных целей. В настоящей главе перечислены фирмы-изготовители, их основная продукция, ее положительные свойства и недостатки.

Следует заметить, что большинство фирм-изготовителей поставляет мембраны высокого качества. В производстве мембранных фильтров наблюдается сильная конкуренция, и поэтому производитель некачественной продукции очень скоро оказывается не у дел. Вместе с тем промышленное производство мембранных фильтров — процесс сложный, требующий высокого искусства и большого опыта. Начать работать в этой области нелегко. И можно не сомневаться в том, что те фирмы, которые изготавливают свою продукцию в широком ассортименте, затратили много усилий для совершенствования технологии производства.

Фирмы-изготовители мембран и фильтров уделяют неодинаковое внимание контролю за качеством производимой ими продукции. По-видимому, это одно из главных обстоятельств, приводящих к отличию продукции одной фирмы от другой. Однако потребитель фактически этого не знает и вынужден полагаться на такие ненадежные вещи, как репутация фирмы, различные мнения о ней и т. п.

Некоторое представление о том, какое внимание фирмы уделяют контролю качества своей продукции, можно получить при тщательном ознакомлении со специальной информацией и технической документацией этих фирм. Однако для тех потребителей, которые очень широко пользуются мембранными фильтрами, могут оказаться оправданными специальные исследования наиболее часто применяемого ими типа

мембраны. Отдельные связанные с этим вопросы мы уже обсуждали в гл. 4.

Ниже в этой главе приводится перечень фирм, изготавливающих и поставляющих мембраны, оборудование для мембранных установок и запасные части к ним. Некоторые из перечисленных фирм выпускают узкий ассортимент продукции, другие предлагают гораздо большую номенклатуру. Этот перечень мы даем для того, чтобы читатель знал, к какой фирме ему нужно обратиться, чтобы он мог купить те или иные мембранные фильтры и соответствующее оборудование, необходимые для его конкретных целей.

«Абкор инкорпорейтед» производит мембраны для ультрафильтрации и промышленное оборудование. Мембраны, выпускаемые этой фирмой, входят в состав аппаратов с трубчатыми и рулонными фильтрующими элементами. Адрес: USA, Abcor, Inc., 850 Main Street, Wilmington, MA 01877. Телефон: 617/657-4250.

«Адапс инкорпорейтед» выпускает не мембраны, а хемотаксисные камеры для работы с мембранными фильтрами. Фирма производит также клеточные культиваторы и микропроцессоры для управления ими. Эти камеры можно также использовать с фильтрами из стекловолокна. Адрес: USA, Adaps, Inc., 300 Greenlodge Street, Dedham, Mass. 02026. Телефон: 617/326-6935.

«Алсоп инжиниринг компани» — это старая фирма, выпускающая глубинные фильтры в виде дисков больших диаметров для применения их при производстве пищевых продуктов и в промышленности. Диски делают из чистой целлюлозы и из смеси целлюлозы с асбестом или с диатомовой землей. Адрес: USA, Alsop Engineering Co., Milldale, CT 06467. Телефон: 203/628-9661.

«АМФ Кюно» производит фильтры Дзета-Плюс с поверхностью, модифицированной таким образом, что она оказывается электрически заряженной. Этот пористый материал находит широкое применение при фильтрации вирусов (см. разд. 12.6). Адрес: USA, AMF, Cuno Division, 400 Research Parkway, Meriden, CT 06450. Телефон: 203/237-5541.

«Амикон» изготавливает ультрафильтрационные мембранные установки, применяемые для концентрирования биологических сред, извлечения микроколичеств различных веществ и фракционирования растворов. Выпускаются также отдельные детали, например ячейки с перемешиванием и мембранные установки на полых волокнах. Более подробно об изделиях этой фирмы см. в разд. 13.4 и 13.5. Адрес: USA, Amicon Corporation, Scientific Systems Division, 21 Hartwell Ave., Lexington, MA 02173. Телефон: 617/861-9600.

«Аква мидье» разрабатывает и поставляет на рынок системы тонкой очистки воды для использования в промышлен-

ности, в том числе при производстве лекарственных препаратов. Фирмой изготавливается также комплектно ионообменники, установки для обратного осмоса и субмикронной фильтрации, а также ультрафиолетовые стерилизаторы, мембранные установки на полых волокнах и мембранные аппараты с фильтрующими элементами рулонного типа для обратного осмоса. Адрес: USA, Aqua Media, 1049 Kiel Court Sunnyvale, CA 94086. Телефон: 408/734-8181.

«Барви а лаки» производит мембранные фильтры под названием Сынпор, по-видимому, из нитроцеллюлозы, причем в ограниченном диапазоне диаметров мембран и размеров пор. Поставляются на экспорт одной внешнеторговой организацией «Хемапол» (ЧССР, Коданска, Прага 10). За соответствующей информацией на чешском языке следует обращаться к изготовителю. Адрес: Czechoslovakia, Barvy a Laky, Zavod 5, Praha 10, Urineves. Телефон: 251 61.

«Байо-Молекьюлэ дайнэмикс» поставляет на продажу серию ячеек для перемешивания Майкропродикон и диализные установки для ультрафильтрации и концентрирования биологических сред. Адрес: USA, Bio-Molecular Dynamics, P. O. Box 668, Beaverton, OR 97005. Телефон: 503/223-9400.

«Байо-Рэд» поставляет на продажу материалы, оборудование и устройства для исследований в области хроматографии, электрофореза, иммунохимии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), а также хемотаксисные камеры для исследования миграции клеток и трековые мембраны типа Нуклепор из поликарбоната (однако по более высоким ценам, чем фирма «Нуклепор!»). Адрес: USA, Bio-Rad Laboratories, 2220 Wright Ave., Richmond, CA 94804. Телефон: 415/234-4130.

«БиДжиАй инкорпорейтед» поставляет оборудование для фильтрации и анализов аэрозолей: насосы, наборы диафрагм, пробоотборники запыленных сред, калибровочное оборудование и мембраны из различных материалов. Мембраны для выпускаемого этой фирмой оборудования изготавливаются фирмой «Шляйхер и Шуль». Адрес: USA, BGI Incorporated, 58 Guinan Street, Waltham, MA 02154. Телефон: 617/891-9380.

«Болстон» изготавливает самое различное оборудование, применяемое в промышленности, например, для коалесцирующей фильтрации сжатого воздуха и других газов, фильтрации проб, подлежащих химическому анализу, для очистки выбросов вакуумных насосов от капель масла, для высокоэффективной фильтрации жидкостей, для очистки пара, с тем чтобы его можно было использовать в стерилизаторах, для очистки воздуха в помещениях от масляных аэрозолей. Устройства, выпускаемые фирмой «Болстон», представляют собой не мембраны, а глубинные фильтры из скрепленных эпоксидной

смолой стеклянных микроволокон. Они применяются в промышленности для тех же (в некоторой степени) целей, что и мембраны, и, кроме того, их используют для культивирования клеток в крупных масштабах. Об их применении для работ с бактериями и вирусами см. гл. 12 и 13. Адрес: USA, Balston, Inc., P. O. Box C, 703 Massachusetts Ave, Lexington, Ma 02173. Телефон: 617/861-7240.

«Боултон корпорейши» производит очень крупные промышленные фильтрационные установки с дисками из бумаги или рейонового волокна, применяемые в фармацевтической, пищевой, керамической, химической и нефтехимической отраслях промышленности. Адрес: USA, The Boulton Corp, 801 S. Great Southwest Parkway, Grand Prairie, TX 75051. Телефон 214/647-0576.

«Брансуик текнетикс» (отделение фирмы «Мембрэйн филтер продактс»). Это сравнительно недавно созданная фирма, предлагающая высокопроизводительные фильтр-патроны с мембранами из полисульфона. Мембраны имеют высокую степень анизотропии и поэтому в течение длительного периода времени способны пропускать через себя большие количества фильтруемой жидкости. Адрес: USA, Brunswick Technetics, Membrane Filter Products, 4116 Sorrento Valley Boulevard, San Diego, CA 92121. Телефон: 714/455-7260.

«Вапоникс» изготавливает главным образом оборудование для очистки воды, а именно установки ультрафильтрации и обратного осмоса для фармацевтической, электронной и других отраслей промышленности. Адрес: USA, Varonics Inc., Cordage Park, Plymouth, MA 02360. Телефон: 617/746-7555.

«Ватман» — старая английская фирма, которая поставляет фильтровальную бумагу для лабораторных нужд на протяжении многих лет. В настоящее время (в целях повышения конкурентоспособности) она стала поставлять и мембраны в основном для лабораторных целей, в том числе для анализа загрязнений воздуха и воды. Эта фирма является также крупным производителем стекловолоконных фильтров. Адрес: USA, Whatman Laboratory Products. Inc., 9 Bridewell Place, Clifton, NJ 07014. Телефон: 201/773-5800.

«Гайа» является частью крупнейшей многонациональной корпорации, в состав которой входят следующие фирмы: «Акзона инкорпорейтед» (г. Ашвил, шт. Сев. Каролина, США), «Акзо Н. В.» (г. Арнхем, Голландия), «Энка А. Г.» (г. Вуперталь, ФРГ) и «Армак компани» (г. Чикаго, шт. Иллинойс, США). «Гайа» — отделение фирмы «Мембрана инкорпорейтед», выпускающее фильтр-патроны для технологических процессов и для стерилизующей фильтрации с мембранами складчатого типа из нейлона. Адрес: USA, Ghia Division, Membrana

Inc., 7070 Commerce Circle, Pleasanton, CA 94566. Телефон: 415/846-8270 или 800/227-1245.

«Гелман» — одна из самых крупных фирм в США, производящая мембраны и сопутствующее оборудование. Располагает очень большим ассортиментом фильтрационных материалов, в том числе мембранами, необычайно устойчивыми к действию растворителей. Она изготавливает также большое число высокопроизводительных фильтр-патронных установок, оборудование для проведения испытаний на стерильность, устройства для фильтрации с тангенциальным потоком и т. д. В отличие от некоторых своих конкурентов, которые поставляют свою продукцию непосредственно на рынок, «Гелман» продает свои изделия также через организации, занимающиеся поставкой научного оборудования. Поэтому ассортимент продукции фирмы «Гелман» можно определить по удобно составленным каталогам этих снабженческих организаций. Однако собственные каталоги этой фирмы содержат более подробную информацию о выпускаемой ею продукции. Адрес: USA, Gelman, Sciences, Inc., 600 South Wagner Road, Ann Arbor, MI 48106. Телефон: 313/665-0651 или 800/521-1520. Фирма имеет также отделение в Англии [10 Harrowden Road, Brackmills, Northampton NN4 0EB, U. K., телефон: (0604)65141].

«Гор-Текс» — крупный производитель тефлоновых мембран, широко применяющихся для стерилизующей фильтрации воздуха. Фирма не осуществляет продажу непосредственно потребителям, а поставляет материал мембран другим фирмам-изготовителям. Адрес: USA, W. L. Gore and Associates, Inc., 101 Lewisville Road, P. O. Box 1550, Elkton, MD 21921. Телефон: 301/392-4440.

«Джонс-Мэнвилл» прежде производила мембранные установки и соответствующее оборудование, но впоследствии продала свою технологическую линию фирме «Нуклепор корпорейшн» (см. ниже).

«Дорр-Оливер» — крупная фирма, производящая широкий спектр промышленного ультрафильтрационного оборудования, используемого при производстве пищевых продуктов и в санитарных целях. Ультрафильтрационные мембраны выпускаются с дренажными подложками в виде плоских кассет, которые можно использовать для фильтрации в различных целях, складывая их в пакеты по нескольку штук. Адрес: USA, Dorr-Oliver Incorporated, 77 Havemeyer Lane, Stamford, CT 06904. Телефон: 203/358-3200.

«Зайтекс» поставляет тефлоновые мембранные фильтры в виде листов из чистого тефлона шириной 30,5 см и длиной до 30 м. Этот материал находит многочисленные применения в промышленности для фильтрации как жидких, так и газовых

сред. Адрес: USA, Chemplast Inc., 150 Dey Road, Wayne NJ 07470. Телефон: 201/696-4700.

«Зейтц» — западногерманская фирма, имеющая давние традиции в области торговли продукцией для фильтрации. Фирма не продает мембран, но предлагает широкий ассортимент композитных фильтров из смеси целлюлозы с асбестом или диатомитом, используемых в промышленности, например при осветлении напитков и изготовлении пищевых продуктов. Предлагаются также фильтры для лабораторных целей. Адрес отделения фирмы в США: Seitz Filters, P. O. Box 538, Milldale, CT 06467. Телефон: 203/628-9664.

«Кокс» производит дисковые фильтры для субмикронной фильтрации широкого ассортимента. Матрицы фильтров представляют собой стеклянные микроволокна или смесь волокон из стекла и целлюлозы, связанных между собой эпоксидной смолой. Имеются диски для задержки частиц размерами от 0,2 до 10 мкм. Толщина этих дисков составляет 780 мкм, что значительно превышает толщину стандартных мембран из эфиров целлюлозы. Однако их используют не только как обычные глубинные фильтры. Дело в том, что эти фильтры существенно анизотропны и лишь приповерхностный слой одной из сторон диска, составляющий 10 % общей толщины диска, имеет поры строго определенного размера. Благодаря этому оказывается возможным пропускать большие количества жидкости через диск, а его забиваемость значительно снижена. Эти фильтры устойчивы к действию самых различных растворителей и используются в целом ряде высокопроизводительных промышленных процессов. Они также широко применяются для выделения вирусов (см. гл. 12). Их поставляют в виде дисков или фильтр-патронов складчатого типа. Адрес: USA, Cox Instrument Division of Lynch Corporation, P. O. Box 212, Grandville, MI 49418. Телефон: 616/532-3662.

«Континентал уотер системс» — это филиал фирмы «Миллипор корпорейшн». В его задачу входит разработка технических условий на проектирование, поставка оборудования и техническое обслуживание систем очистки воды с использованием ионного обмена, обратного осмоса, ультрафильтрации и мембранной фильтрации. Адрес: USA, Continental Water Systems Corporation, P. O. Box 20018, El Paso, TX 79998. Телефон: 915/852-9090.

«Миллипор» — старейшая в США фирма по производству мембранных фильтров. На протяжении многих лет слова «мембрана» и «миллипор» использовали как синонимы даже в научной литературе. Эта фирма первой для изготовления мембранных фильтров осуществила процесс Сарториуса (соответствующая документация была привезена А. Гетцем из Европы после

второй мировой войны [170]). Фирма поставляет очень широкий ассортимент мембран разных размеров и модификаций, изготавливаемых из различных материалов, а также оборудование для мембранных установок, в том числе фильтр-патроны для фильтрации больших количеств жидкостей. Продукция фирмы «Миллипор» очень доступна, а каталог ее изделий обычно имеется в каждой лаборатории, занимающейся мембранной фильтрацией. Филиал фирмы «Миллипор» — «Континентал уотер системс» — поставляет установки обратного осмоса и другое оборудование для получения высококачественной воды (см. выше). Адрес: USA, Millipore Company, Bedford, Ma 01730. Телефон: 616/275-9200 или 800/225-1380.

«Майкрофилтрейшн системс» — название американского отделения японской фирмы «Тоё Роси Каиса, лимитед», которая продает продукцию последней. «Тоё Роси Каиса» производит оборудование для фильтрации начиная с 1916 г. Несмотря на то что для японской экономики характерен высокий уровень технологии, мембраны внедрялись довольно медленно [154]; однако в настоящее время «Майкрофилтрейшн системс» предпринимает попытки активизироваться на внешнем рынке. Она поставляет высокопроизводительные мембранные установки и некоторые комплектующие устройства и изделия, такие, как фильтродержатели, устройства для испытаний на стерильность, ячейки с перемешиванием и камеры для хемотаксиса. Фирмой делаются мембраны из нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы и регенерированной целлюлозы, а кроме того, стекловолоконные фильтры. Очень большое внимание фирма уделяет контролю за качеством выпускаемой продукции, цены которой несколько ниже цен аналогичной продукции других фирм. Адрес: USA, MFS Micro Filtration Systems, 6800 Sierra Court, Dublin, CA 94566. Телефон: 415/828-6010.

«Нуклепор» (часто употребляют неправильное название «Нуклеопор»!) поставляет трековые мембраны из поликарбоната, разработанные впервые сотрудниками «Дженерал электрик компани» [75]. В последние годы фирма «Нуклепор» начала продавать также собственные мембраны сетчатого типа из целлюлозы под торговым наименованием Мембра-Фил, приобретя право на их производство у фирмы «Джонс-Мэнвил компани». «Нуклепор» производит различное вспомогательное оборудование и запасные части к установкам своих мембран и мембран других фирм. Фирма выпускает также установки обратного осмоса, фильтрации и ячейки с перемешиванием. Благодаря уникальным ситовым свойствам трековых мембран из поликарбоната и их химической стойкости мембраны Нуклепор находят широкое применение как при исследовательских работах, так и в промышленности. Нуклепор являются единствен-

ными мембранами, которые обладают истинно ситовыми свойствами [97]. Чтобы отличить трековые мембраны Нуклепор от традиционных мембран сетчатой структуры, фирма предлагает называть первые «мембранами с капиллярными порами», а вторые — «мембранами с извилистыми порами». Адрес: USA, Nuclepore Corporation, 7035 Commerce Circle, Pleasanton, CA 94566. Телефон: 415/462-2230.

«Нью-Инглэнд нуклиэ корпорейшн» продает мембраны, специально предназначенные для работы с рекомбинантными ДНК (см. гл. 11). Эти мембраны, имеющие название Джен Скрин, являются значительно менее хрупкими, чем нитроцеллюлозные мембраны, обычно используемые при исследованиях рекомбинантных ДНК. Мембраны Джен Скрин представляют собой собственность фирмы и не рекомендуются для использования в обычной мембранной фильтрации. Адрес: USA, New England Nuclear Corp., 549 Albany Street, Boston, MA 02118. Телефон: 617/482-9595.

«Нэлдж компани» не является производителем мембран, а поставляет разнообразное фильтрационное оборудование из пластмасс. К специфической продукции этой фирмы относятся фильтрационные аналитические ячейки одноразового использования с установленными в них мембранами. Приемные резервуары некоторых из этих установок могут быть непосредственно соединены с вакуумными насосами. Хотя фирма «Нэлдж» и предлагает к своим установкам широкий спектр мембран, сама она, вероятно, их не производит. Вся продукция «Нэлдж» распространяется многими поставщиками лабораторного оборудования. Адрес: USA, Nalge Company, Division of Sybron Corporation, P. O. Box 365, Rochester, NY 14602.

«Оксоид» — английская фирма, производящая главным образом питательные среды для микробиологических исследований. Наряду с этим фирма предлагает и мембраны для лабораторных работ, изготавливаемые английской фирмой «Курто лимитед»: Адрес: Oxoid, Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 0PW, U. K. Телефон: 0256 61144. В США эта фирма имеет отделение по адресу: USA, 9017 Red Branch Road, Columbia, MD 21045. Телефон: 301/997-2216.

«Осмоникс» поставляет на рынок мембраны и соответствующее оборудование для обратноосмотической и ультрафильтрационной очистки воды. Адрес: USA, Osmonics, Inc., 15404 Industrial Road, Hopkins, Minnesota 55343. Телефон: 612/933-2277.

«Пол» на протяжении многих лет поставляет на рынок промышленное фильтрационное оборудование, а в последнее время и мембранные фильтры из нейлона. Эти мембраны являются гидрофильными без добавления смачивающих агентов и, следовательно, содержат небольшое количество экстрагируемых

веществ, главным образом найлоновых полимеров низкой молекулярной массы. Фирма продает дисковые мембранные фильтры и фильтр-патроны, а также соответствующее оборудование. Главное назначение изделий фирмы «Пол» — это промышленная фильтрация, но она поставляет и дисковые мембраны из найлона для лабораторных исследований. Адрес: USA, Pall Trinity Micro Corporation, Cortland, NY 13045. Телефон: 607/753-6041.

«Пюропор» прежде была отделением фирмы «Пюролэйтор», производившей фильтры для автомобильной и аэрокосмической промышленности, а в настоящее время она является филиалом фирмы «Гелман сайенсиз». «Пюропор» разработала серию уникальных анизотропных мембран, называемых Тиран-М/Е [124]. У этих мембран размеры пор меняются по глубине, и лишь тонкий приповерхностный слой одной из сторон мембраны имеет поры требуемого размера. Забиваемость таких мембран значительно меньше, а скорость потока жидкости через них больше, поэтому они очень хорошо подходят для культивирования бактерий, подвергнутых стрессу, при анализе на содержание ФКП. Мембраны фирмы «Пюропор» более или менее сходны по своим характеристикам с мембранами Миллипор-НС, но имеют более высокую степень анизотропии. Адрес: USA, Puro-pore Inc., 14322 Chambers Road, Tustin, CA 92680. Телефон: 714/731-8151.

«Ромикон» производит мембранные фильтр-патроны из полых волокон для выполнения процессов ультрафильтрации как в промышленных, так и в лабораторных условиях. «Ромикон» является филиалом фирм «Ром и Хаас компани» и «Амикон корпорейшн». Адрес: USA, Romicon, Inc., 100 Cummings Park, Woburn, Ma 01801. Телефон: 617/935-7840.

«Савиллекс» поставляет установки с мембранами из тефлона, а также сопутствующие изделия и запасные части для лабораторных работ с коррозионными средами. Адрес: USA, Savillex Corporation, 5325 Highway 101, Minnetonka, MN 55343. Телефон: 612/934-4050.

«Сарториус» — западногерманская фирма, которая стала первой производить мембранные фильтры [170]. Технология именно этой фирмы была перемещена в США после второй мировой войны, что по существу и положило начало современному промышленному производству мембранных фильтров в США. «Сарториус» до сих пор поставляет разнообразные мембранные фильтры, в том числе такие, которые, кроме этой фирмы, нигде не изготавливаются. Фирма выпускает очень широкий ассортимент продукции включая мембраны и фильтры как для лабораторных исследований, так и для промышленного применения. Производятся также комплектующие изде-

лия и сопутствующее оборудование, необходимое при эксплуатации мембранных установок. Адрес в США: Sartorius Filters Inc., 26575 Corporate Ave., Hayward, CA 94545. Телефон: 415/783-6612. Адрес головной фирмы в ФРГ: Sartorius GmbH, Weender Landstrasse 94-108, P. O. Box 19, 3400 Gottingen, W. Germany. Телефон: (05 51)308-1. Имеются также представительства этой фирмы в Голландии, Англии, Франции, Италии и Австрии.

«Серфилко» не производит мембран, но поставляет глубинные фильтр-патроны, используемые как предфильтры в самых различных промышленных процессах мембранной фильтрации. Фирма поставляет широкий спектр высокопроизводительного оборудования для процессов фильтрации различных жидкостей. Адрес: USA, Serfilco Ltd., Division of Service Filtration Corporation, 1234 Depot Street, Glenview, IL 60025. Телефон: 312/998-9300.

«Силэс», поставляет уникальные металлические фильтры, полученные спеканием гранул чистого серебра. У них значительно меньшая пористость, чем у обычных мембранных фильтров, зато они могут работать при высоких температурах. Например, серебряные фильтры применяют для улавливания твердых частичек из дымовых газов коксовых печей во избежание превышения допустимых норм, устанавливаемых правительственным законодательством по охране окружающей среды. Их также широко используют в электронной промышленности. Регенерируют фильтры путем выжигания удержанных частиц (причем допускаются температуры выше 500°C) и обработкой кислотами, причем для этой цели подходит любая кислота, кроме азотной и серной. Адрес: USA, Sela Corporation of America, 1957 Pioneer Road, Huntingdon Valley, PA 19006. Телефон: 215/672-0400.

«Спектрум» поставляет стеклянные изделия и оборудование для ультрафильтрации и диализа, в том числе мембраны на основе полых волокон. Фирма также поставляет мембраны Нуклепор. Адрес: USA, Spectrum Medical Industries, Inc., 48 Middle Village Station, Queens, NY 11379. Телефон: 212/894-2200.

«Стар системс» производит волоконные глубинные фильтры для промышленного применения, главным образом в плоско-рамных фильтрационных системах. Адрес: USA, Star Filtration Division, 101 Kershaw Street, P. O. Box 518, Timmonsville, SC 29161. Телефон: 803/356-3101.

«Филтерит» представляет собой еще одно отделение фирмы «Брансуик текнетикс» (см. выше), производящее рулонные патроны на основе фильтров из самых различных материалов, в том числе из хлопка, рейона, полипропилена, стекловолокна, нейлона, акрила и т. д. Хотя эти фильтрующие устройства и

не применяются для стерилизации, их широко используют для фильтрации вирусов (см. гл. 12). Фирма изготавливает наряду с этим фильтр-патроны со складчатыми мембранами из полиолефинов. Адрес: USA, Filterite, Timonium, MD 21093. Телефон: 301/252-080.

«Фишер сайентифик» является крупным поставщиком установок для ультра- и микрофильтрации под зарегистрированным названием Спектрал/Пор. Эта фирма продает изготавливаемые другими производителями мембраны из поликарбоната и целлюлозы, а также детали, запасные части и устройства для использования в процессах ультра- и микрофильтрации. Уникальными являются поставляемые фирмой фильтры Спектра/Меш из тканого найлона с калиброванными отверстиями от 1 до 70 мкм. У них значительно меньшая пористость, чем у мембран, и они очень дороги, но весьма полезны в определенных специальных случаях. Адрес: USA, Fisher Scientific Company, 711 Forbes Ave., Pittsburgh, PA 15219. Телефон: 412/562-8300.

«Флэндерс» изготавливает установки для фильтрации воздуха и устройства для очистки воздуха в помещениях, в системах с ламинарным потоком и для удаления радиоактивных загрязнений. Адрес: USA, Flanders Filters Inc., P. O. Box 1219, Washington, NC 27889. Телефон: 919/946-8081.

«Шляйхер и Шуль» — старая западногерманская фирма, имеющая крупные производственные мощности в США. Она начинала с выпуска фильтровальной бумаги, но постепенно перешла на производство мембран, главным образом для лабораторных целей. Мембранные фильтры начали выпускаться этой фирмой с 1967 г. Все они производятся в ФРГ, тогда как фильтровальная бумага и стекловолоконные фильтры — в США. Фирма поставляет широкий ассортимент мембран, стекловолоконных фильтров и фильтровальной бумаги для различных областей применения макрофильтрации. Выпускаются также комплектующие изделия и сопутствующее оборудование для разных областей применения в биомедицине и в клинической практике, в особенности в хроматографии и электрофорезе. Фирма является одним из главных поставщиков мембран, применяемых при исследовании нуклеиновых кислот. Адрес в США: Schleicher and Schuell, Inc., 543 Washington St., Keene, NH 03431. Телефон: 603/352-3810. Адрес в ФРГ: Schleicher and Schuell, GmbH, D-3354 Dassel, West Germany.

«Эртэл инжиниринг компани» производит оборудование для переработки и упаковки жидких продуктов и крупногабаритные дисковые глубинные фильтры либо из целлюлозы, либо из смеси асбеста и целлюлозы; последние предназначены для субмикронной стерилизующей фильтрации. Адрес: USA, Ertel Engineering Co., Kingston, NY 12401. Телефон: 914/331-4552.

Глава 6

Выбор и использование мембранных установок

6.1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящей главе будут изложены некоторые основные принципы выбора мембранных установок для их практического применения. Здесь будет идти речь лишь о жидкостной фильтрации; фильтрацию воздуха мы обсудим в гл. 14. Любое применение мембранных установок является сугубо индивидуальным, и в последующих главах мы рассмотрим более подробно конкретные области применения мембран. Здесь же мы обсудим общий подход к проектированию мембранных установок с использованием мембранных фильтров.

Мембранная установка включает в себя наряду с мембраной фильтродержатель и весь комплекс устройств и технических средств, обеспечивающих процесс мембранного разделения. Хотя мембрана и является самым важным компонентом этой установки, сама по себе она не может принести какую-либо пользу. Только будучи оформленной в виде мембранного модуля, она может успешно осуществлять свою функцию. Значительную часть этой главы мы и посвятим необходимому для эксплуатации мембран оборудованию.

6.2. ВОПРОСЫ, ВОЗНИКАЮЩИЕ ПРИ ВЫБОРЕ МЕМБРАННОЙ УСТАНОВКИ

Прежде чем приступить к проектированию мембранной установки, предназначенной для практического использования, следует задаться следующими вопросами.

1. Какая среда будет фильтроваться — газ или жидкость? (Фильтрация газовых систем обсуждается в гл. 14.)

2. Что является целевым продуктом фильтрации — фильтрат или задержанные мембраной частицы? Если последние, то нужно ли проведение специальных анализов, например взвешивания, микроскопирования или прокрашивания? В случае необходимости таких анализов мембрану следует выбирать из

требования ее совместимости с условиями проведения анализов.

3. Каков размер самых малых из подлежащих выделению частиц? Как правило, размер пор следует выбирать так, чтобы он был *чуть* меньше самых малых частиц при максимальной производительности¹. Следует напомнить о том, что существует разница между *максимальным* размером пор, полученным на основе испытаний по методу пузырька, и *средним* размером пор, т. е. размером средней поры данной мембраны. В табл. 4.1 приведены некоторые данные по примерным характеристикам задержки мембран с различными значениями точки пузырька.

4. Каков объем фильтруемой жидкости? Если он мал, то требования к оборудованию не слишком сложны, но, если требуется профильтровать много жидкости, установка должна быть спроектирована соответствующим образом.

5. Будет ли установка работать под давлением или фильтрация будет идти под вакуумом? Если первое, то каков должен быть перепад давления?

6. Какой раствор подлежит фильтрованию, водный или неводный? В последнем случае как мембрана, так и фильтродержатель должны быть стойкими к действию растворителя.

7. Какими соединительными шлангами будет снабжена установка — тайгоновыми², силиконовыми, тефлоновыми или трубками из нержавеющей стали? Какова температура, при которой будет проходить фильтрация? Будет ли процесс периодическим или непрерывным? Будут ли специальные указания в отношении того, как обращаться с фильтратом (например, содержать ли его далее в стерильных условиях)?

8. Какой должна быть производительность установки? Каким временем фильтрации мы располагаем?

Последующее изложение направлено на то, чтобы получить ответы на все эти вопросы.

6.3. РАЗМЕР ЧАСТИЦ ФИЛЬТРУЕМОЙ СРЕДЫ

Как уже отмечалось в гл. 2, в зависимости от размеров фильтруемых частиц различают четыре процесса фильтрации. **Диализ и обратный осмос** — это процессы, когда отфильтровываются самые малые частицы размером порядка 10 ангстрем

¹ Выбор оптимального размера пор производится на основе анализа зависимости селективности мембран данного типа от величины пор. — *Прим. ред.*

² Тайгон — поливинилацетат, выдерживает автоклавирование (30 мин, 126 °C). — *Прим. ред.*

(1 нм) и меньше. Обычно это молекулы с молекулярной массой менее 1000 или ионы. Обратный осмос используют для очистки или обессоливания воды. Поскольку в таких процессах участвуют, как правило, большие объемы жидкости, здесь обычно применяют мембранные модули патронного типа. Эти процессы обсуждаются в гл. 13.

Ультрафильтрация — процесс, в ходе которого отделяют макромолекулы и частицы размером 10—200 ангстрем. Молекулярная масса таких частиц лежит в пределах 1000—100 000. Ультрафильтрация применяется для концентрирования или обезвоживания растворов белков или иных макромолекул и для разделения коллоидных систем. Этот процесс также рассматривается в гл. 13.

Микрофильтрация предназначена для выделения коллоидных частиц с размерами от 200 ангстрем до 10 мкм. Вблизи нижней границы размеров микрофильтрация соответствует, вообще говоря, выделению вирусов, здесь ее трудно отличить от ультрафильтрации. Напротив, вблизи верхней границы размеров она переходит в макрофильтрацию¹. Рассмотрению микрофильтрации в основном и посвящена настоящая глава.

Макрофильтрация — процесс выделения из растворов или суспензий крупных частиц. Их размеры, как правило, превышают 10 мкм. Цель макрофильтрации — либо осветление жидкости, либо отделение частиц для их дальнейшей обработки. Обычно для этого применяют не мембраны, а волоконные, или, как мы называем их, глубинные фильтры, сделанные из бумаги, асбеста, различных полимеров или стекловолокна. Макрофильтрация зачастую комбинируется с мембранной фильтрацией как предварительная ступень для отделения крупных частиц; это позволяет повысить скорость, с которой жидкость может протекать через мембрану.

6.4. МЕМБРАНЫ И ФИЛЬТРЫ ДЛЯ МИКРОФИЛЬТРАЦИИ

Существует три типа полупроницаемых перегородок для микрофильтрации — волоконные или глубинные фильтры, традиционные микропористые мембранные фильтры и капиллярно-пористые или трековые мембраны, у которых поры образуются в результате облучения пленки заряженными частицами (Нуклепор). Глубинные фильтры используются главным обра-

¹ В отечественной литературе вместо термина «макрофильтрация» используется термин «обычная фильтрация». — *Прим. ред.*

зом для макрофльтрации, однако на шкале размеров частиц, близкой к нижней границе, они могут использоваться и для микрофльтрации. Тонкие глубинные фильтры делаются обычно из стекловолокна, они могут задерживать частицы с номинальным размером вплоть до 0,7 мкм. Преимуществом этих фильтров является то, что по сравнению с мембранами их производительность при задержке частиц тех же размеров существенно выше. Однако они имеют ряд недостатков: 1) частицы удерживаются внутри матрицы фильтра и, следовательно, не могут быть использованы для анализа; 2) они могут выделять в фильтрат небольшие волокна; 3) их нельзя испытать на целостность по методу пузырька; 4) из-за большой площади поверхности они могут адсорбировать очень большое количество компонентов фильтруемой жидкости; 5) в случае фльтрации под давлением частицы, первоначально удержанные фильтром, могут оказаться в фильтрате; 6) в течение продолжительных циклов фльтрации в их объеме может происходить рост микроорганизмов с последующим попаданием их в фильтрат.

Заметим, что в глубинном фильтре бо́льшая часть отделяемых веществ задерживается на глубинах, составляющих от поверхности фильтра 10—20 % его общей толщины, так что толстые глубинные фильтры не обязательно обладают более высокой емкостью по сравнению с более тонкими. Особенности процесса фльтрации с глубинными фильтрами определяются главным образом свойствами фильтрующего материала (стекло, целлюлоза и т. д.), а не толщиной.

Традиционные мембранные фильтры значительно тоньше глубинных, но также обладают сетчатой структурой и действуют, по крайней мере отчасти, как глубинные. Существует множество мембран различной формы и размера с широким диапазоном селективности. Этот тип перегородок наиболее пригоден для микрофльтрации. Их можно испытывать на целостность методом пузырька.

Фильтрующие каналы мембран Нуклепор имеют правильную цилиндрическую форму (см. разд. 3.6). Эти мембраны ближе к истинным ситам, чем любой другой тип промышленных фильтров, и значительно тоньше традиционных мембранных фильтров. По сравнению с мембранами сетчатого типа плотность пор у них меньше, производительность ниже и они быстрее забиваются. Их используют главным образом в случае ответственного разделения, когда частицы должны оставаться строго на поверхности (например, для микроскопического исследования), или при необходимости разделения самих частиц по размерам (ситование). Несмотря на то что мембраны Нуклепор можно использовать для обычной фльтрации,

их низкая пропускная способность и быстрое забивание делают их в данном случае малоэффективными¹.

Главным предметом обсуждения в настоящей главе является микропористая мембрана. Мембранные фильтры изготавливаются в двух основных модификациях, а именно в виде дисков и патронов. Диски всех мембран могут иметь диаметры 13—293 мм, а размеры пор 0,1—10 мкм. Диски малых размеров применяют главным образом в аналитических целях, а больших размеров — для промышленных процессов фильтрации объемом до 400 л. Однако задачи действительно крупномасштабной фильтрации можно решать с помощью мембран в виде фильтр-патронов.

6.5. МЕМБРАННЫЕ МОДУЛИ ПАТРОННОГО ТИПА

Наличие широкого ассортимента освоенных промышленностью мембранных модулей в виде патронов (фильтр-патроны) делает возможным применение при фильтрации более высоких давлений и обеспечение существенно больших поверхностей фильтрации по сравнению с дисковыми мембранами. Вообще, говоря, скорость забивания мембранного модуля является функцией площади поверхности мембраны, через которую протекает жидкость, и поэтому скорость забивания патронных мембранных модулей значительно ниже из-за относительно большой площади их поверхности.

При изготовлении фильтр-патрона большой лист мембраны выдерживают в специальной среде, например в глицерине для того, чтобы сделать его более эластичным, затем делают в нем складки и сворачивают, как показано на рис. 6.1, а. Полученную таким образом складчатую мембрану прикрепляют к центральному сердечнику из пластмассы, который имеет щелевидные отверстия. Наконец, на эту систему надевается наружный защитный каркас, после чего патрон при помощи клеящей композиции, например эпоксидной смолой, соединяется по обоим концам герметизирующими его концевыми колпачками. В некоторых фильтр-патронах мембраны изнутри и снаружи прокладываются сложенными таким же образом листами-каркасами или фильтрами предварительной очистки для сообщения конструкции большей прочности и уменьшения скорости забивания (рис. 6.2).

¹ На самом деле, судя даже по данным, приведенным в каталогах фирм «Миллипор» и «Нуклепор», производительность по воде у трековых мембран (в диапазоне размеров пор 0,1—8 мкм) в 1,5—7 раз выше, чем у мембран из ацетил- или нитроцеллюлозы. Следует помнить также, что, хотя трековые мембраны имеют пористость в 5—10 раз меньшую, чем сетчатые мембраны, они в 10—50 раз тоньше последних.— *Прим. ред.*

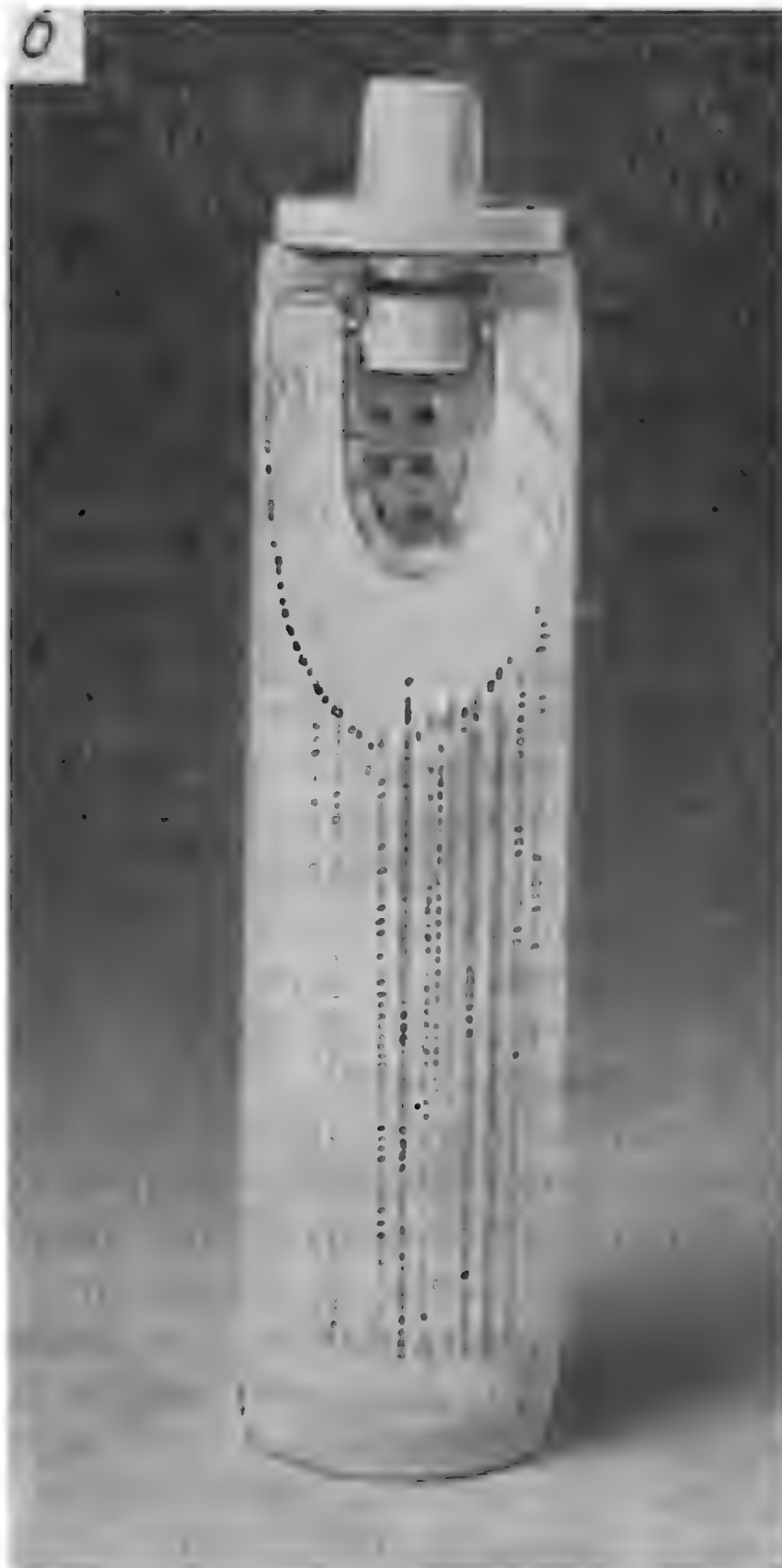
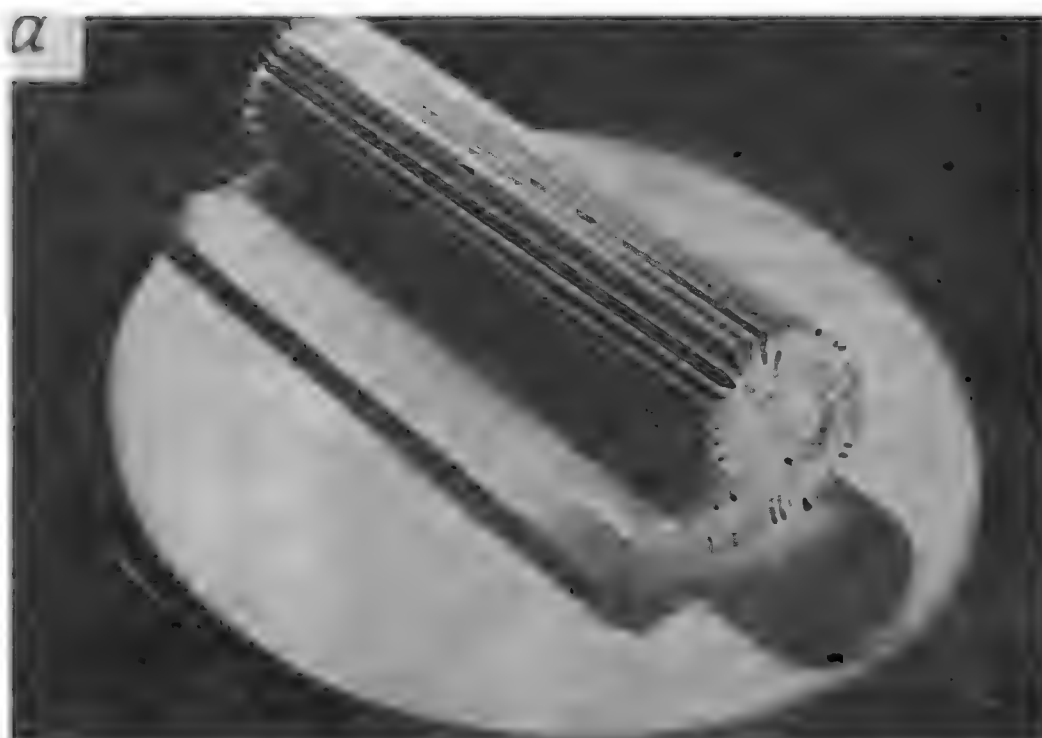


Рис. 6.1. Фильтр-патрон. а — гофрирование листа мембраны как первая стадия изготовления фильтр-патрона; б — продольный разрез собранного фильтр-патрона; видны внутренний сердечник, наружный каркас, концевые колпачки; показано также, как вставляются кольцообразное уплотнение и адаптер корпуса. (С разрешения фирмы «Нуклепор».)

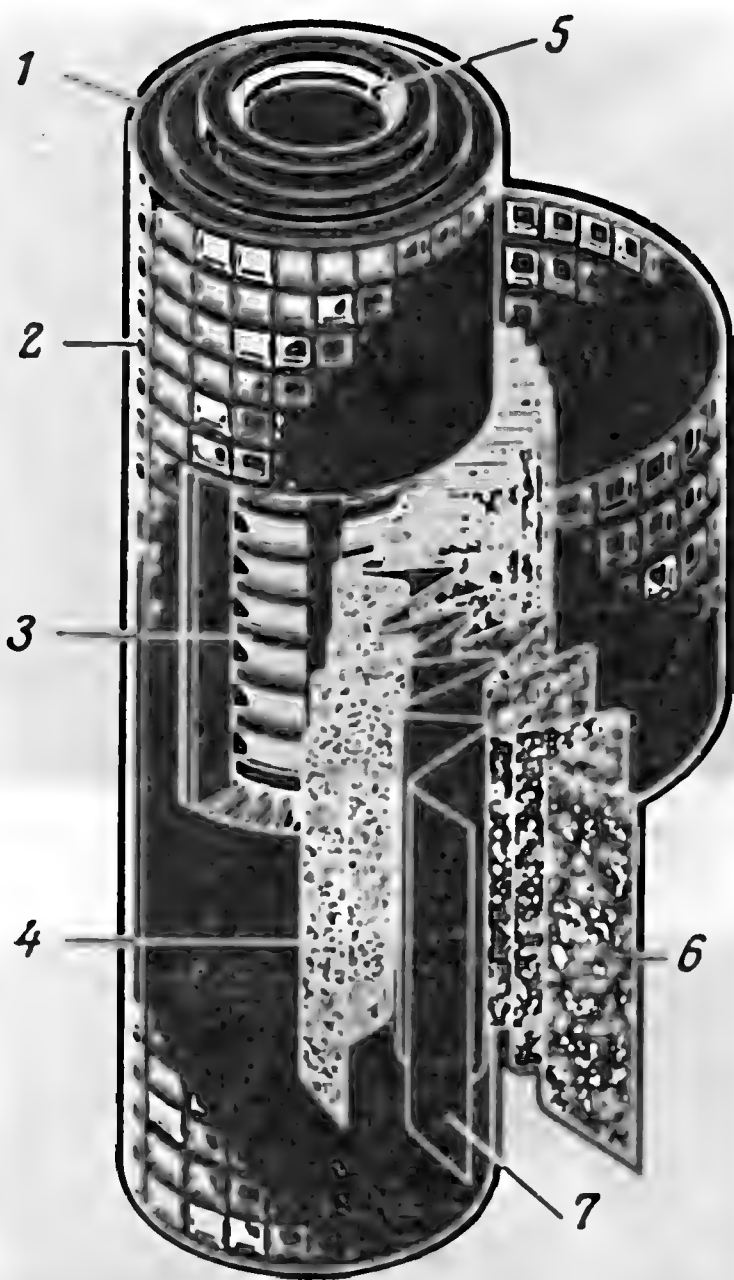


Рис. 6.2. Устройство фильтр-патрона с составной мембраной (по типу выпускаемых фирмой «Мембрана, инк.»). 1 — концевой колпачок; 2 — защитный наружный каркас; 3 — внутренний сердечник; 4 — сетчатая подложка; 5 — литое уплотнение; 6 — волокнистый предфильтр; 7 — мембрана с порами диаметром 0.2 мкм.

Фильтр-патроны рекомендуется использовать в тех случаях, когда объем фильтруемой жидкости превышает 400 л. По сравнению с дисковыми мембранами они могут работать при существенно более высоких значениях перепадов давления. Готовый патрон помещают в специальный корпус обычно из нержавеющей стали (рис. 6.3, а). Внутри стального корпуса патрон фиксируется при помощи специальных прокладок или колец. Жидкость, подлежащая фильтрации, втекает в патрон с наружной стороны, проходит через складчатую мембрану к центру патрона и покидает его через отверстие в нижней части устройства (рис. 6.3, б). Для повышения производительности фильтровальной установки патроны можно соединять последовательно или параллельно. Технические условия фирм-изготовителей на фильтр-патрон содержат сведения о средней площади фильтрующей поверхности, размере пор и условиях работы (даются значения температуры, перепада давления и т. д.). Имеются фильтр-патроны с размерами пор от 0,2 до 1,0 мкм. Мембраны для них делают из эфиров целлюлозы, политетрафторэтилена (тефлона), нейлона или акрила. Для проверки фильтр-патронов на целостность используют метод точки пузырька (см. разд. 4.2 и 7.5).

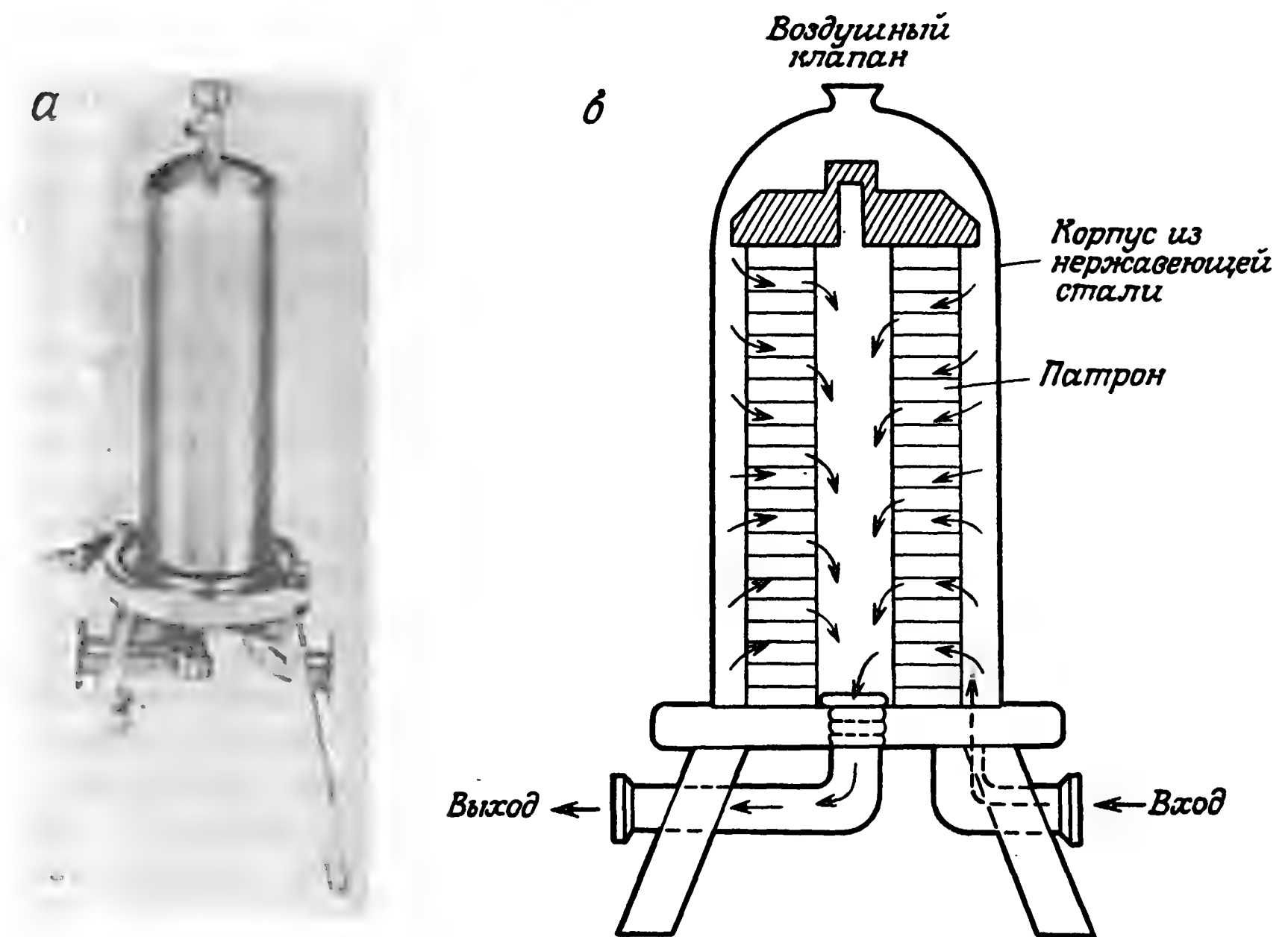


Рис. 6.3. Общий вид фильтр-патрона в корпусе из нержавеющей стали (а), а также принцип его действия со схемой внутреннего устройства и картинкой потоков фильтруемой жидкости через него (б). (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз, инк.»)

Существует большое число самых разнообразных конструкций корпусов для патронных фильтров. Каждая фирма, производящая фильтр-патроны, снабжает их концевыми колпачками собственной конструкции, так что тот или иной корпус мембранного аппарата может оказаться неподходящим для размещения в нем фильтр-патрона, выпускаемого другой фирмой. Однако многие изготовители фильтр-патрона во избежание указанной сложности выпускают специальные переходники (адаптеры), которые позволяют добиться взаимозаменяемости корпусов фильтр-патронов. Рекомендуется тщательный выбор корпуса мембранного аппарата, поскольку его стоимость высока. Мембранные модули патронного типа могут отличаться конструкциями, материалами и уплотнениями, которыми удерживается патрон в корпусе. В идеальном случае прежде всего следует выбрать сам фильтр-патрон и лишь затем покупать корпус, выпускаемый той же фирмой-изготовителем.

Большинство корпусов для фильтр-патронов изготавливают из нержавеющей стали (марки 316), стойкой против коррозии. Отводящие штуцеры корпусов фильтр-патронов, применяемых

в промышленности, отличаются конструктивно от патрубков у корпусов фильтр-патронов санитарного назначения¹. Первые, имеющие на конце резьбы, соединяются с трубой при помощи обычных фитингов с нарезкой. Санитарные отводные штуцеры соединяются с трубой плоскими фланцами, между которыми находится прокладка. Снаружи фланцевое соединение охватывает хомут [часто обозначаемый как Т-С (от англ. слов Tri-Clamp или Tri-Clover); см. рис. 6.3, а]. Преимуществом отводов санитарного типа является то, что их значительно проще очищать, поскольку в них отсутствует резьба, на которой могут скапливаться частицы.

Уплотнение между патроном и корпусом имеет особое значение, поскольку через неплотности фильтруемая жидкость может пройти мимо мембраны и попасть в фильтрат. Для фильтр-патронов с размерами пор 1,0 мкм и больше работает удовлетворительно простая плоская прокладка, закрепленная на открытом конце патрона. Один недостаток такого технического решения заключается в том, что к патрону нужно приложить значительное усилие, чтобы достигнуть хорошего уплотнения у его открытого конца; такое «концевое усилие» может разрушить патрон и мембрану. Чтобы этих нагрузок не возникало, в патронах для фильтрации частиц с размерами менее 1,0 мкм применяются кольцевые уплотнения круглого сечения. Последние располагаются в желобках внутри открытого конца патрона и прижимаются к корпусу патрона давлением снаружи (рис. 6.4). Такое «боковое усилие» вызывает значительно меньшую нагрузку на патрон. Кольцевое уплотнение всегда применяют при микрофильтрации, например при стерилизующей фильтрации.

Имеются фильтр-патроны различной длины (рис. 6.4), что позволяет подобрать практически любую площадь фильтрующей поверхности для той или иной конкретной задачи фильтрации.

Кроме того, имеются запрессованные в корпус неразъемные фильтр-патроны (называемые фирмой «Гелман» *капсулами*), которые рекомендуются для фильтрации жидкостей объемом порядка 20—600 л (рис. 6.5). Они допускают значительно более высокие скорости фильтрации, чем мембранные аппараты дискового типа и более удобны в пользовании по сравнению с обычными съемными фильтрами-патронами. Для них не требуется отдельного корпуса, и их можно устанавливать совместно

¹ Речь идет об использовании мембранных аппаратов патронного типа для работ, включающих правила асептики (медицинская промышленность, биотехнология), и для работ, не требующих соблюдения этих условий (например, в химической технологии, при очистке воды и т. п.).— *Прим. ред.*



Рис. 6.4. Фильтр-патроны различной длины с одинаковым диаметром 7,4 см. (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз, инк.»)

с другими фильтрующими устройствами. Некоторые типы капсул следует автоклавировать, другие же являются уже предварительно стерилизованными. Имеются капсулы с размером пор 0,2 мкм для целей стерилизации, а также капсулы с размером пор 0,45 мкм для фильтрации воды, когда абсолютная стерильность не требуется; кроме того, имеются капсулы с еще большими размерами пор для целей осветления. Капсульные фильтр-патроны очень удобны для установок средней производительности.

Ниже приводятся преимущества фильтрации с помощью капсул по сравнению с фильтрацией на дисковых мембранах большого размера:

Дисковые мембраны

Высокие капитальные затраты
Опасность внесения загрязнения
внутрь фильтродержателя

Отдельные мембраны не испытывают
предварительно на целостность

Требуют большого рабочего про-
странства, громоздки и трудны в об-
ращении

Фильтродержатели необходимо часто
автоклавировать перед употребле-
нием и прочищать между отдельны-
ми циклами работы

Высокие эксплуатационные затраты
Каждая отдельная мембрана не мар-
кируется

Капсульные фильтр-патроны

Экономичны при использовании
Опасность загрязнения отсутствует

Перед отгрузкой и после приобретения
испытываются на целостность

Компактны, по размерам, легко уста-
навливаются

Автоклавирования не требуется, по-
скольку капсулы предварительно
стерилизуются, и отсутствуют какие-
либо детали, требующие очистки

Не требуют специального ухода

На каждой капсуле указывается номер
партии, характеристика продукта,
размер пор и ограничения по темпе-
ратуре и давлению

Разница в стоимости дисковых мембран и капсул не слиш-
ком значительна. Если в стоимость дискового фильтродержа-
теля включить стоимость запасных частей и оплату труда по
его эксплуатации, то капсульный фильтр может зачастую ока-
заться экономически предпочтительней. Эффективная площадь
фильтрующей поверхности одной капсулы эквивалентна эф-
фективной площади дисковой мембраны диаметром 293 мм.



Рис. 6.5. Капсульный фильтр-патрон с площадью поверхности мембраны 1480 см². (С разрешения фирмы «Гельман сайенсиз, инк.»)

Некоторые фирмы поставляют на рынок фильтр-патроны не с мембранами, а с обмотанными вокруг центрального сердечника волокнами. Такие фильтры производят фирмы «Филтерит корпорейшн», «Карборундум корпорейшн», «Серфилко инк.», «Мембрана инк.» и «Абкор инк.» Эти фильтр-патроны с волокнами достаточно малого диаметра и аккуратно намотанными на стержень в тщательно сконструированном устройстве можно использовать для отделения частиц размером менее 1 мкм. Хотя они и не подходят для целей стерилизации, их можно использовать для осветления жидкостей или для предварительной фильтрации замутненных жидкостей перед стерилизацией. Поскольку волокнистые фильтр-патроны действуют как глубинные фильтры, они позволяют достигнуть значительно более высокой производительности по сравнению с мембранными фильтрами. Волокнистые фильтр-патроны выпускает также фирма «Болстон». Волокна в фильтрах этой фирмы не наматываются на стержень, а образуются стеклянными микро-волокнами, соединенными друг с другом смолой, так что образуется глубинный фильтр. Наименьшие частицы, которые задерживает фильтр-патрон фирмы «Болстон», имеют размер 0,3 мкм. Фильтр-патроны для ультрафильтрации и обратного осмоса обсуждаются в гл. 12. Обзор конструкций, вопросы изготовления и оценка работы фильтр-патронов представлены в работе [49].

6.6. РАСЧЕТ НЕОБХОДИМОЙ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ МЕМБРАН

Площадь поверхности мембран можно рассчитать, исходя из заданной производительности процесса. Один из способов решения этого вопроса заключается в делении объема фильтруемой жидкости на время процесса фильтрации. Для вычисления площади поверхности используется график, такой, как на рис. 6.6. Он отражает зависимость между скоростью потока жидкости через мембраны с различными размерами пор и величиной перепада давления в системе. Большинство фирм-изготовителей приводят для своих мембран в виде дисков и патронов зависимости такого типа. Поскольку приведенные на графиках значения скоростей потока являются *исходными*, т. е. не отражают эффект забивания пор мембран, необходимо каким-то образом учитывать забивание пор. Один из возможных простых способов состоит в умножении найденной из графиков площади поверхности на множитель, равный примерно 5, чтобы быть уверенным, что этого достаточно для завершения процесса. Вводить поправку следует также, если вязкость фильтруемой жидкости отлична от вязкости воды (например, вязкий

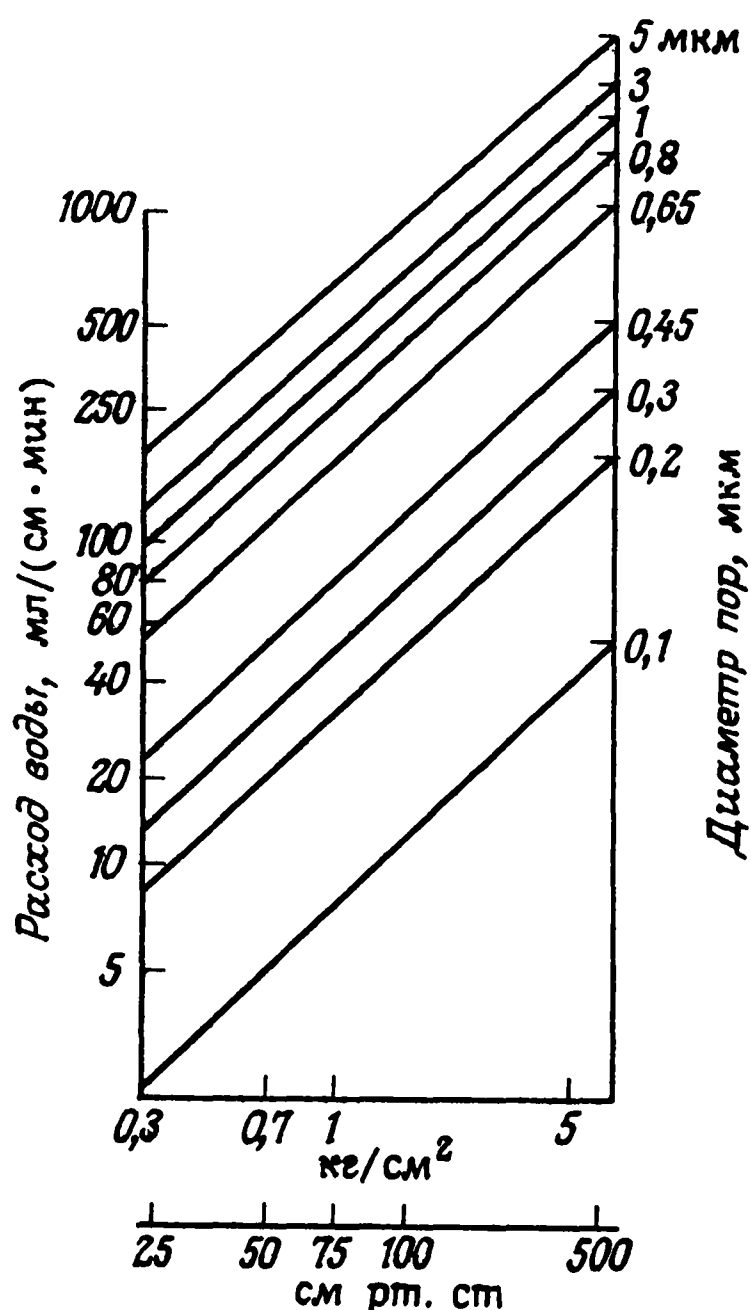


Рис. 6.6. Значения расходов воды при различных давлениях для мембран из нитроцеллюлозы с разными диаметрами пор. (Заимствовано из технической документации фирм-изготовителей.)

раствор сахара). Поскольку вязкость воды равна примерно 1 сантипуазу, подобную корректировку можно осуществить, деля скорость потока воды через мембрану на вязкость фильтруемого раствора в сантипуазах.

В качестве иллюстрации такого расчета рассмотрим следующий пример. Предположим, что через мембрану с порами 0,65 мкм нужно профильтровать 50 л раствора сахара с вязкостью 5 сантипуаз, процесс необходимо провести за 4 ч или менее при давлении 0,3 кг/см². Из графика на рис. 6.6 мы находим, что начальный расход для данного размера пор должен быть равен 50 мл/(см²·мин); разделив эту величину на 5 (вязкость раствора), получим значение начального расхода 10 мл/(см²·мин). Для того чтобы обеспечить требуемую производительность 50 л за 4 ч, что эквивалентно примерно 200 мл/мин, площадь поверхности мембраны должна быть равна 20 см². Умножая полученное значение на 5 как на фактор запаса, получаем площадь фильтрующей поверхности 100 см². Очевидно, приобретая некоторый опыт, мы сможем понизить величину фактора запаса и получить, таким образом, меньшее значение площади фильтрующей поверхности. Дисковые мембраны имеют размеры в пределах 13—293 мм. Можно подсчитать, исходя из геометрических соображений, что дис-

ковая мембрана диаметром 142 мм должна обеспечить необходимую для нашего примера площадь фильтрующей поверхности.

Более точный способ определения необходимых для работы размеров мембраны особенно для крупномасштабных процессов, когда существенной становится ее стоимость, заключается в получении «падающей кривой скорости потока» для фильтруемой жидкости. Для этого используют мембрану небольшого диаметра и пропускают через нее раствор под тем же давлением, что и в реальном процессе фильтрации. Измеряют скорость потока в начале процесса (мл/мин), а затем через последовательные промежутки времени. Как правило, скорость потока уменьшается со временем по линейному закону, до тех пор пока не наступит момент резкого изменения этой зависимости. Начальный линейный участок этой зависимости определяется забиванием отдельных пор; когда же забиваются все поры, скорость потока резко уменьшается. Момент времени, когда происходит резкое изменение скорости потока, определяется природой фильтруемого материала. Таким образом, необходимо зарегистрировать полный объем жидкости, который прошел через мембрану к моменту времени, при котором произошло резкое изменение потока жидкости, и выполнить соответствующие расчеты по формуле, приведенной ниже. Необходимая для процесса фильтрации площадь S поверхности мембраны определяется формулой

$$S = 1,5 (V/v) s,$$

где s — площадь поверхности контрольной мембраны; V — объем жидкости, которая должна быть отфильтрована; v — объем жидкости, отфильтрованной до момента времени, когда происходит резкое уменьшение скорости потока через фильтр; множитель 1,5 представляет собой фактор запаса, учитывающий возможные ошибки и изменения фильтруемых объемов, в разных процессах фильтрации.

Заметим, что эта формула содержит допущение о том, что вязкость фильтруемой жидкости та же, что и у воды (1 сП). В случае вязких растворов площадь поверхности, вычисленную по этой формуле, нужно умножить на вязкость фильтруемой жидкости (в сантипуазах).

В большинстве случаев приходится проводить серию экспериментов с различными мембранами как с использованием предфильтров, так и без них. Поэтому цель состоит в том, чтобы найти такую комбинацию мембраны с одним или большим числом предфильтров, которая позволила бы пропустить через мембрану с наименьшей площадью поверхности наибольшие объемы жидкости.

Хейн в работе [99] привел приблизительные значения расходов некоторых жидкостей, которые можно фильтровать через мембрану с размером пор 5 мкм до тех пор, пока скорость потока не упадет до предельно низкого значения:

Жидкость	Расход ($\text{м}^3/\text{м}^2$)
Вода из глубоких колодцев	1000
Растворители	500
Вода из водопровода	200
Вино	50
Фармацевтические препараты в ампулах	50
20 %-ный раствор глюкозы	20
Растворы витаминов	10
Растворы для парентерального введения	10
Арахисовое масло	5
Концентрат фруктового сока	2
Сыворотка (7 % белка)	0,6

Площадь поверхности мембраны в виде фильтр-патрона самому потребителю оценить нелегко, и он должен искать эти данные в сопровождающей фильтр-патрон технической документации. Различные фирмы-изготовители производят фильтр-патроны с некоторыми отклонениями по площади поверхности, даже если патроны имеют одинаковые внешние размеры. Площадь фильтрующей поверхности стандартных фильтр-патронов диаметром 6,35 см и длиной 25,4 см составляет, как правило, 0,45 м^2 .

Фактическая производительность мембраны с данной площадью поверхности и объем профильтрованной жидкости будут определяться до некоторой степени характером процесса забивания. Можно предположить, что забивание мембраны протекает по двум механизмам. 1) Эффект ситования, когда частицы, большие по размерам, чем поры, перекрывают собой устья пор. Худший случай здесь имеет место, когда размеры частицы и поры почти совпадают, поскольку такая частица может подойти к поре и полностью ее заблокировать. Блокирование поры частицей значительно большего размера менее опасно, поскольку какой-то поток жидкости еще возможен в обход частицы. 2) Образование перемычек, когда частицы существенно меньших размеров, чем поры, прилипают друг к другу, а также к краям поры. В ходе фильтрации такие перемычки перекрывают отверстие поры. Вначале эти перемычки могут играть даже положительную роль, поскольку эти соединения частиц могут выполнять функцию фильтра, но в конечном счете они блокируют столь много пор, что поток через мембрану прекращается.

Зачастую производительность мембраны можно значительно увеличить, используя предфильтр для удаления крупных ча-

стиц (см. гл. 7). Анализ распределения частиц по размерам в жидкости может способствовать более разумному подбору комбинации предфильтра и основной мембраны.

6.7. УСТРОЙСТВО ФИЛЬТРОВАЛЬНЫХ УСТАНОВОК С ДИСКОВЫМИ МЕМБРАНАМИ

Фирмы-изготовители поставляют на рынок огромное множество различных деталей, устройств и запасных частей для комплектации фильтровальных установок. В настоящем разделе кратко рассматриваются некоторые из имеющихся устройств. Здесь речь идет лишь о дисковых фильтродержателях для дисковых мембран; мембраны в патронном исполнении мы рассматривали в разд. 6.5 и обсудим их более подробно в гл. 7.

Мембраны являются весьма хрупкими изделиями, а, поскольку они работают в условиях, когда имеет место перепад давления, их необходимо помещать в фильтровальную установку таким образом, чтобы сохранить их целостность, т. е. они не должны быть разорваны или поломаны. Большинство фирм-изготовителей поставляют специальные устройства для продаваемых ими мембран, причем многие из этих устройств оказываются пригодными и для мембран, производимых другими фирмами.

Вакуумная фильтрация. Аппарат для вакуумной фильтрации представляет собой простейшее устройство (рис. 6.7). Оно состоит из трех основных частей: фильтродержателя, воронки и специального зажима. В фильтродержателе имеется плотно посаженный пористый диск (из стекла, тефлона или нержавеющей стали в зависимости от материала корпуса), пронизываемый для жидкости и служащий хорошей подложкой для мембраны. Воронку располагают таким образом, что она оказывается точно напротив мембраны и фильтродержателя. С помощью зажима мембрану закрепляют достаточно плотно, чтобы исключить подтеки жидкости по ее периферии. Очень важно, чтобы этих подтеков не было, иначе часть фильтруемой жидкости либо минует мембрану и попадет в фильтрат, либо просачивается снаружи воронки.

При фильтрации под вакуумом большие перепады давления на мембране не возникают, поскольку даже при самом глубоком вакууме перепад давлений составляет лишь 1 атм (т. е. 10^5 Н/м², 760 мм рт. ст. или около 1 кг/см²). Таким образом, вакуумные аппараты можно использовать для большинства обычных процессов фильтрации, когда нужно пропустить небольшое количество жидкости, а точное регулирование перепада давлений не обязательно. Однако в связи с отсутствием регулирования

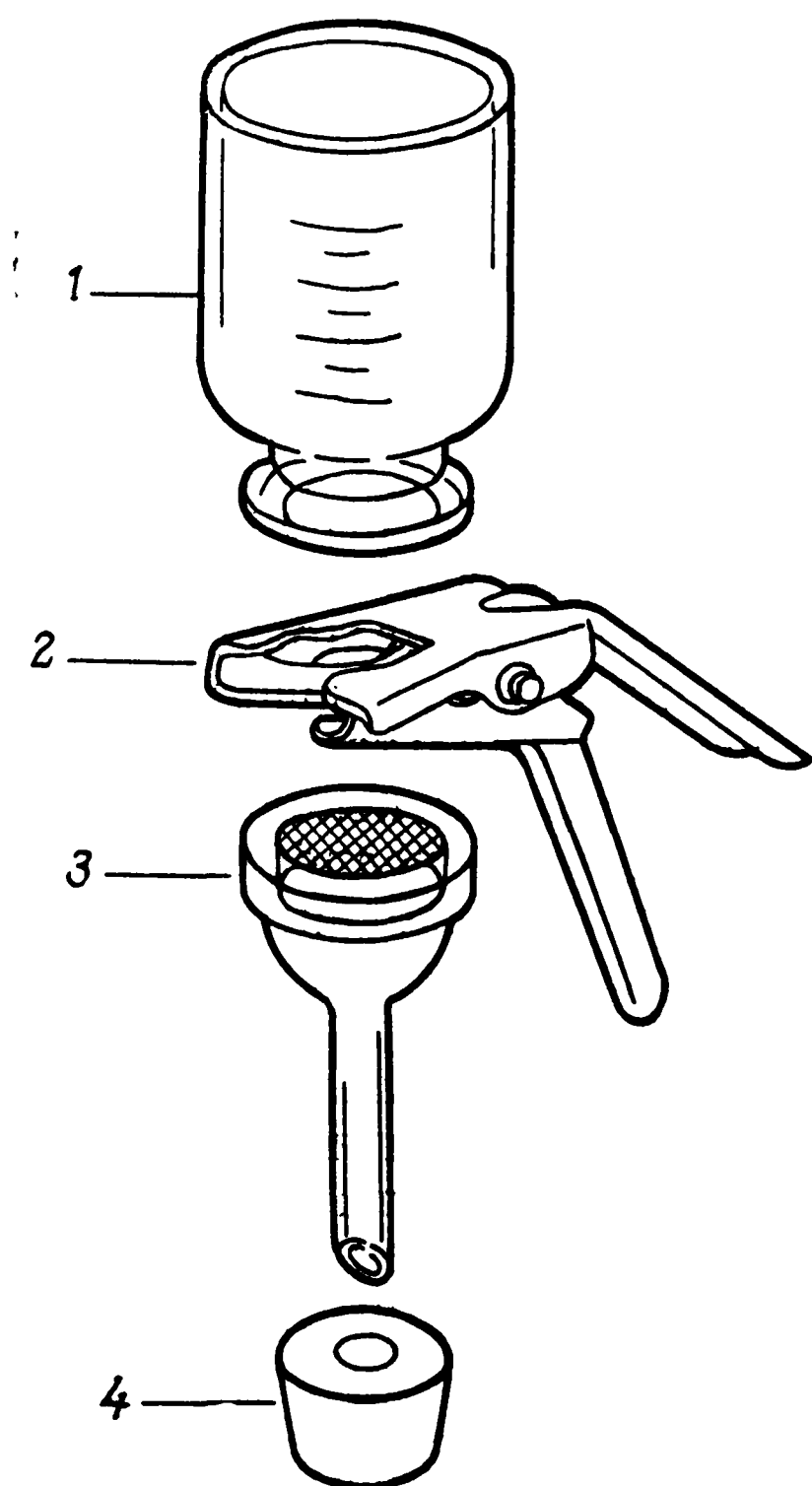


Рис. 6.7. Элементы устройства для фильтрации под вакуумом. Будучи изготовленной из стекла, установка может быть подвергнута стерилизации с вставленной в нее мембраной или без нее. 1 — стеклянная воронка с уплотнением; 2 — алюминиевый зажим; 3 — фильтродержатель с подложкой из пористого стекла; 4 — резиновая пробка, вставляемая в колбу Бунзена.

перепада давления не рекомендуется применять вакуумную фильтрацию суспензий, содержащих хрупкие частицы, которые могут разрушиться под действием давления. Кроме того, при такой фильтрации белковых растворов или других биополимеров выходящий после мембраны поток может вспениваться и приводить к денатурации фильтрата.

Фильтрация под давлением. В крупных масштабах фильтрацию проводят, как правило, под давлением; при этом необходимо осуществлять тщательный контроль перепада давления. Однако следует напомнить о том, что давление, показываемое манометром, не то же самое, что перепад давления в системе, поскольку выходная сторона мембраны находится под атмосферным давлением. Таким образом, перепад давления на мембране представляет собой разницу между давлением, показываемым манометром, и атмосферным давлением (760 мм рт. ст.). Фильтрация под давлением позволяет достигнуть более высокой производительности, чем вакуумная фильтрация, поскольку в первом случае перепад давления можно увеличивать по необходимости. Фильтрация под давлением не вызывает

вспенивания, что делает ее предпочтительной применительно к растворам, содержащим белок (например, сывороткам). Кроме того, при фильтрации под давлением сведено к минимуму непреднамеренное загрязнение фильтрата, и это единственный процесс, который позволяет напрямую заполнять стерильно флаконы и ампулы непосредственно после мембраны. Очень важное значение приобретает фильтрация под давлением в случаях, когда имеют дело с вязкими системами. И наконец, это значительно более безопасный процесс при работе с горючими и воспламеняющимися жидкостями, такими, как растворители, поскольку в отличие от фильтрации под вакуумом он не приводит к накоплению паров этих жидкостей.

На рис. 6.8 показаны типичные устройства для фильтрации под давлением, а на рис. 6.9 изображены отдельные компоненты фильтродержателя дисковых мембран большого диаметра. Подлежащая фильтрации жидкость, как правило, содержится в сосуде под давлением, снабженном входным и выходным патрубками (рис. 6.10). Давление в сосуде создается либо насосом, либо сжатым воздухом или инертным газом типа азота (последний предпочтительней). Выходной патрубок соединен с приемным сосудом, выходной конец которого подсоединяется к устройству фильтрации воздуха. Последнее устройство необходимо применять в тех случаях, когда важно соблюдать стерильность, поскольку могут происходить либо флуктуация давления, либо сброс давления из системы по завершении процесса фильтрации, а это может явиться причиной кратковременного создания разрежения со стороны выходного патрубка и подсоса воздуха в систему.

Дисковые мембраны из нитроцеллюлозы (или из смешанных эфиров целлюлозы) могут приклеиваться к нержавеющей стали, в то время как для мембраны из ацетилцеллюлозы этого не происходит. В случае когда мембраны из нитроцеллюлозы используются с оборудованием из нержавеющей стали, соответствующие поверхности следует покрыть тефлоном, чтобы предотвратить склеивание. Большинство фирм-изготовителей поставляют фильтродержатели из нержавеющей стали, покрытые тефлоном, однако при этом необходимо помнить, что такие покрытые тефлоном поверхности во избежание их разрушения нужно чистить мягким материалом типа губки.

Мембраны, предназначенные для фильтрации под давлением, устанавливаются в защитных оболочках, с тем чтобы иметь возможность, подняв давление, увеличить их производительность. В системе с параллельной установкой мембран один и тот же поток проходит одновременно через несколько фильтрующих устройств, содержащих одинаковые мембраны. Отфильтрованные жидкости собирают со всех устройств и объединяют



Рис. 6.8. Фильтродержатели дисковых мембран, используемых для фильтрации под давлением (начиная с заднего по часовой стрелке): $\varnothing$ 293 мм (промышленного типа); $\varnothing$ 293 мм (санитарного типа); $\varnothing$ 90 мм (промышленного типа); $\varnothing$ 90 мм (санитарного типа); $\varnothing$ 142 мм (санитарного типа). (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз».)

в один общий фильтрат. Общая производительность такой системы равна сумме производительностей через каждую отдельную мембрану. При параллельной фильтрации перепад давления на мембранах меньше, при этом на каждой мембране всей установки перепад давления будет тем же. Поэтому увеличение перепада давления при забивании мембраны можно избежать, если установить достаточное число фильтрующих устройств, так чтобы к концу процесса фильтрации перепад давления был небольшим (0,15—0,2 атм). Пропускание через мембрану жидкостей с небольшими скоростями потока способствует продлению ее срока службы, в противном случае различные примеси, проникая глубоко в поры мембраны, забивают ее. Параллельная фильтрация нашла широкое применение также и для мембран в патронном исполнении, когда отфильтрованные каждой мембраной жидкости также объединяются в конечный фильтрат.

В последовательных фильтровальных системах несколько аппаратов устанавливают друг за другом, при этом фильтруемая жидкость проходит последовательно сквозь каждую мембрану. Такие системы позволяют увеличить производи-

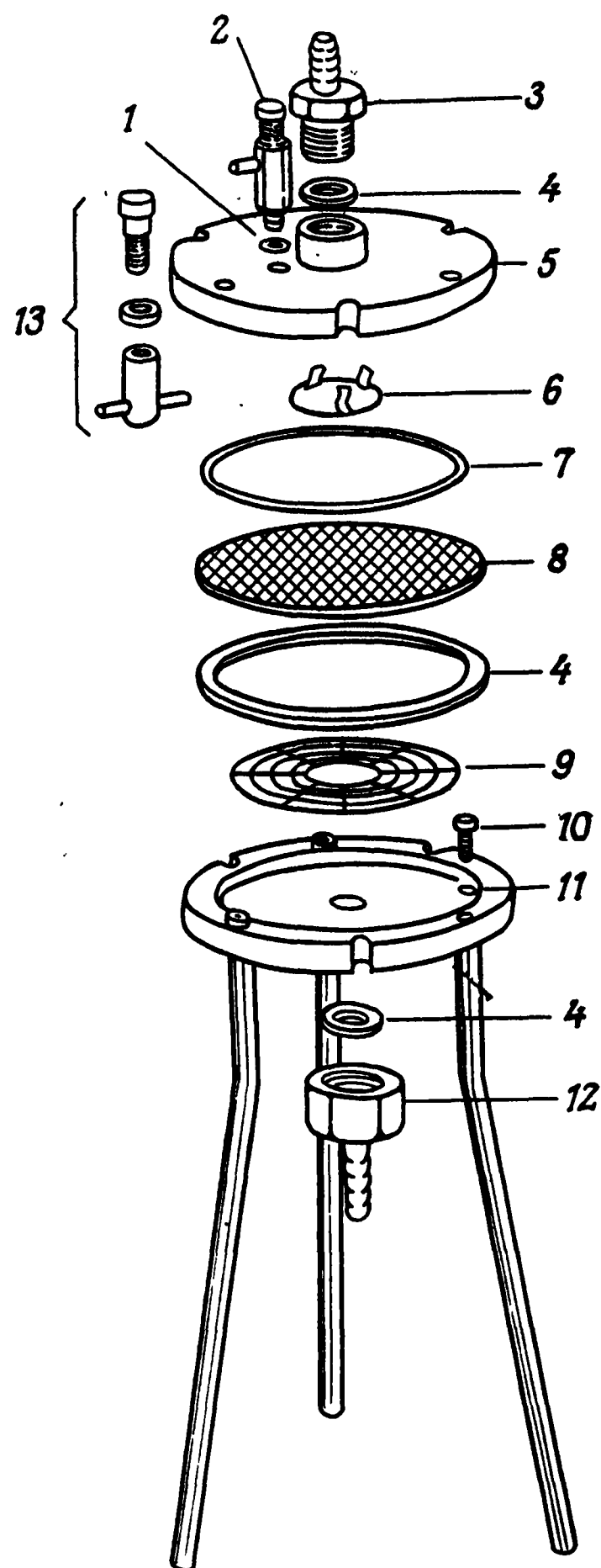


Рис. 6.9. Устройство для фильтрации больших объемов жидкости с использованием дисковой мембраны. 1 — кольцевая прокладка; 2 — воздушный клапан; 3 — входной штуцер; 4 — тефлоновые прокладки; 5 — верхний фланец; 6 — отражатель потока; 7 — кольцевая прокладка из силиконовой резины; 8 — подложка с мембраной; 9 — дренажная подложка; 10 — болт крепления ножки; 11 — прокладка под болт крепления ножки; 12 — выходной штуцер; 13 — быстросъемное крепление.

ность фильтровальной установки в тех случаях, когда последняя мембрана в ней слишком быстро выходит из строя. Обычно устанавливают сначала грубые фильтры, а заканчивают тонкими фильтрами или мембранами. Первые по ходу фильтруемой жидкости аппараты работают как предфильтры, поскольку нагрузка, приходящаяся на них, способствует уменьшению нагрузки на последующие фильтры или мембраны. В последовательных системах скорость потока жидкости одинакова через все фильтры и мембраны и определяется сопротивлением последней мембраны, которая имеет, как правило, самые малые поры. Перепад давления во всей системе равен сумме перепадов на каждой мембране.



Рис. 6.10. Общий вид установки для фильтрации под давлением. (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз».)

На рынке имеется несколько типов устройств для фильтрации под давлением, что обеспечивает определенную гибкость в выборе аппарата с требуемой площадью поверхности мембран, позволяя для одного и того же процесса использовать различное число дисковых мембран. В работе [159] приведено описание такого типичного устройства под названием «One-Seveneg». Фильтродержатель, на котором может быть закреплено от одного до семи дисковых мембран, сконструирован таким образом, что при забивании одной мембраны поток жидкости направляется к другой.

Независимо от того, какая из фильтровальных установок используется — вакуумная или под давлением, — очень важно, чтобы мембрана была плотно посажена в корпус фильтродержателя с помощью зажимов или кольцевых уплотнений. То, насколько плотно вставлена мембрана в фильтродержатель, можно проверить, используя метод пузырька. При неправильной установке давление в точке пузырька будет очень низким, либо будет отчетливо видна утечка воздуха.

Шприц-насадки. В тех случаях когда объем фильтруемой жидкости невелик, в особенности если необходимо соблюдение асептических условий, лучше всего использовать фильтродержатель, соединенный со шприцем (рис. 6.11). Эти держатели имеются на рынке под различными наименованиями: Суинни

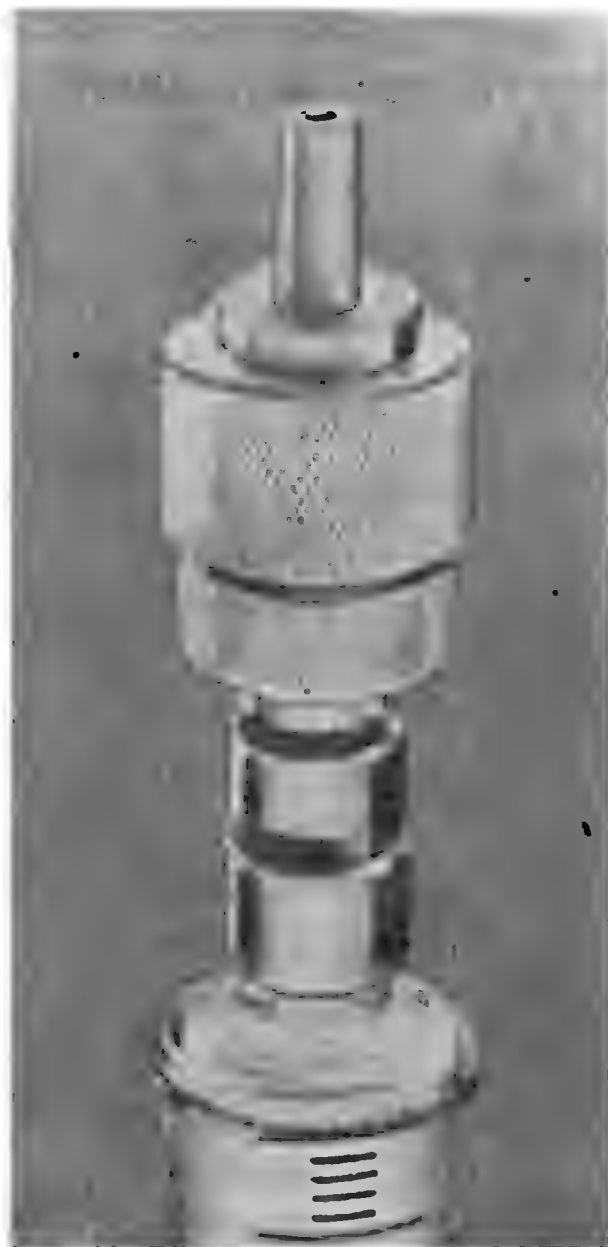


Рис. 6.11. Шприц-насадка из нержавеющей стали типа Суинни с мембраной диаметром 13 мм. (С разрешения фирмы «Миллипор корпорейшн».)

и Суиннекс фирмы «Миллипор», Суин-Лок фирмы «Нуклепор» и Акродиск фирмы «Гелман». Множество различных шприц-насадок выпускает фирма «Сартorius». Имеются шприц-насадки как многократного, как и одноразового использования; последние продаются, будучи предварительно стерилизованными вместе с мембраной. Для сверхтонкой очистки при фильтрации небольших объемов жидкости или для обработки клинических препаратов с целью подсчета в них количества жизнеспособных микроорганизмов шприц-насадки особенно полезны. Такие устройства должны быть всегда под руками при проведении каких-либо лабораторных работ, требующих асептических условий как в обычной практике, так и в экстренных случаях.

Толщина мембраны Нуклепор намного меньше, чем у сетчатых мембран, поэтому в обычных фильтродержателях их уплотнить значительно сложнее, особенно в системах фильтрации под давлением. Фирма «Нуклепор» сама производит фильтродержатели, которые мы рекомендуем использовать. Если по-какому-либо не окажется фильтродержателя нужного размера, под мембрану типа Нуклепор можно поместить фильтр из тонкого стекловолокна, заполнив им пустое пространство в фильтродержателе, и обеспечить таким образом ровное закрепление мембраны. Разумеется, этот совет хорош лишь

в том случае, если частицы, содержащиеся в фильтруемых растворах, не попадают в фильтрат, а задерживаются мембраной¹.

6.8. НЕКОТОРЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДИСКОВЫХ МЕМБРАН

Границы применения мембранных фильтров столь широки, что трудно перечислить все области, где их используют. Поэтому в настоящем разделе мы рассмотрим некоторые из проблем, которые могут возникнуть в конкретных случаях применения мембран.

● Напомним, что понятие химической совместимости относится не только к мембранам при их использовании с неводными системами, но и ко всей фильтровальной установке в целом, т. е. к фильтродержателю, воронке, пористой подложке, уплотняющим прокладкам, а также к входным и выходным патрубкам. Фильтровальные установки изготавливаются из стекла, нержавеющей стали и поликарбоната. Фирмы-изготовители информируют о химической совместимости с теми или иными средами даже таких частей фильтровальной установки, как уплотнительные кольца.

О стерилизации растворов методом мембранной фильтрации см. в гл. 7.

● При обращении с мембраной следует избегать касания ее пальцами, так как жир или пот, имеющиеся на них, могут стать причиной появления несмачивающихся участков мембраны. Следует пользоваться пинцетами с плоскими концами, которые продаются специально для этого. Пинцеты с острыми концами могут вызвать порезы или разрывы мембраны. Для обращения с сухими мембранными фильтрами имеются «вакуумные пинцеты» или пипетки с присосками.

● При извлечении мембраны из упаковочной коробки ее следует проверить и убедиться в том, что она не имеет отверстий или разрывов.

● Большие мембраны (с диаметрами дисков 90 мм и больше) следует при манипуляциях с ними придерживать всегда в двух местах.

● Перед установкой мембран нужно всегда вынимать прокладки из голубой бумаги между ними. Запомните! Сама по себе мембрана никогда не бывает голубого цвета. Для извле-

¹ Весьма существенное замечание: в противном случае возможна, например, неконтролируемая адсорбция фильтруемых частиц на фильтре-подложке.— *Прим. ред.*

чения прокладки нужно ее согнуть вместе с мембраной так, чтобы они стали выпуклыми и, просунув концы пинцета между двумя прокладками, вытащить мембрану.

● Для удобства размещения мембраны в фильтродержателе на концы пинцета полезно надеть небольшие отрезки трубочек из резины или тайгона.

Проблемы снятия статического заряда с сухих мембран решаются при помощи специальных устройств¹, которые продаются некоторыми фирмами-изготовителями фильтров.

● Во многих случаях не существует функциональной разницы между матовой и глянцевой сторонами мембраны, однако для некоторых применений она имеется. Мембраны упаковывают обращенной кверху глянцевой стороной, и именно этой стороной кверху лучше устанавливать мембрану в фильтродержателе.

● Если мембрану предполагается использовать для того, чтобы собрать частицы и определить потом их массу в сухом состоянии, то для сохранения массы постоянной во время сушки необходимо выбирать те мембраны, которые рекомендуются фирмой-изготовителем. Напомним, что многие мембраны гигроскопичны или потенциально гигроскопичны, поэтому существенной является защита мембраны от поглощения ею влаги. Перед употреблением для удаления из материала мембраны экстрагируемых веществ ее нужно обязательно промыть, затем просушить в печи и непосредственно перед применением охладить в эксикаторе.

● Диаметр мембранного диска должен быть несколько больше того, который мы получили, согласно вашим оценкам, для обеспечения необходимой вам производительности мембраны (см. разд. 6.6).

● Производительность мембраны при данном размере пор может меняться в зависимости от степени ее анизотропии ([124] и разд. 4.3). При возможности забивания следует подбирать мембрану в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя.

● Некоторые из фильтрующих материалов могут выделять в фильтрат тонкие волокна. В особенности это относится к фильтрам из свекловолокна, но и некоторые мембраны на основе целлюлозы также способны выделять небольшое количество волокон. В очень ответственных случаях, когда по условиям фильтрации требуется полное отсутствие в фильтрате

¹ Для снятия электростатического заряда с мембран используют ионизацию воздуха вокруг них. Источником ионов могут служить нанесенные на подложку тонкие слои радиоактивных веществ. Зарубежные фирмы используют для этого изотоп Po^{210} , нанесенный на подложку размером $1,5 \times 0,3 \times 0,1$ см (500 микроюри). — *Прим. ред.*

каких-либо частиц, следует провести соответствующие испытания материала мембраны, чтобы убедиться в отсутствии указанной проблемы.

- Для непосредственного микроскопирования частиц, задержанных на мембране, важное значение имеют ее оптические свойства. Для этой цели некоторые из мембран имеют более подходящую поверхность, чем другие. Поэтому, прежде чем проводить такие исследования, необходимо выполнить соответствующие испытания мембраны (см. гл. 8).

- В отдельных случаях в целях микроскопического анализа бывает необходимо, чтобы мембрана была прозрачной. Для этого материал мембраны подвергают некоторым изменениям. Если мембрану можно высушить, то ее всегда можно сделать прозрачной, заполнив поры соответствующей жидкостью с показателем преломления таким же, как и у материала матрицы мембраны (см. разд. 8.2). В своей технической документации фирмы-изготовители сообщают значение показателей преломления для выпускаемых ими мембран (см., например, табл. 4.4).

- Для флюоресцентной микроскопии можно приобрести черные мембраны. Однако различные фирмы-изготовители производят мембраны с различным флюоресцирующим фоном. Как правило, оказывается, что черные мембраны из нитроцеллюлозы лучше, чем из ацетилцеллюлозы, по-видимому, благодаря применению особого черного красителя. Возможна также окраска мембран в лабораторных условиях с использованием иргаланового черного (см. разд. 8.3 и 8.5).

- При необходимости фильтрации горячих жидкостей в течение длительного времени важным является термическая устойчивость мембраны. Поэтому при выборе мембраны следует изучить данные фирм-изготовителей, касающиеся максимально допустимой температуры ее применения.

- Если наличие токсинов или экстрагируемых веществ в мембране может повлечь за собой нежелательные последствия, следует выбирать такую мембрану, которая содержит минимальное количество экстрагируемых веществ. Напомним, однако, что изготовители особое внимание обращают на токсины и экстрагируемые вещества главным образом лишь в тех случаях, когда мембраны используются в медицинской промышленности (стерилизующая фильтрация препаратов для инъекций и т. п.), так что в некоторых применениях наличие различных экстрагируемых веществ может вызвать осложнения.

- В некоторых случаях мембрана подлежит растворению или сжиганию. Для этого имеются мембраны с низким содержанием золы.

- При выборе мембран необходимо учитывать прочность материала, из которого они изготовлены. У мембран, работаю-

щих под давлением, она должна быть выше, чем у работающих под вакуумом. В технической документации фирм-изготовителей имеются данные по величине усилия на разрыв для данного материала мембраны.

- Следует ли рассматривать вопрос о воспламеняемости мембран? Некоторые материалы характеризуются значительно более высокой воспламеняемостью, чем другие. Тефлоновые мембраны практически невоспламеняемы, тогда как мембраны из нитроцеллюлозы воспламеняются при температуре 180 °С.

- Напомним, что при фильтрации может понадобиться использование предварительного фильтра для удаления тех частиц, которые могут забивать мембрану. При этом предварительный фильтр и мембрану можно разместить в одном фильтродержателе или два отдельных фильтродержателя соединить последовательно.

- Для некоторых микробиологических исследований желательно, чтобы на мембране была нанесена сетка. Напомним, что некоторые красители, которыми наносят сетку на мембрану, могут оказаться токсичными для некоторых микроорганизмов (см. разд. 4.8 и 9.2). Поэтому, прежде чем использовать мембрану, необходимо провести соответствующие испытания, чтобы убедиться в отсутствии влияния красителя на извлекаемые микроорганизмы.

- Для анализа на стерильность антибиотиков и других бактериостатических веществ (см. разд. 7.8) имеются мембраны с гидрофобными краями. Наличие несмачивающегося кольца шириной 6 мм по краю мембраны диаметром 47 мм предотвращает подтекание бактериостатика под уплотнения, так что весь бактериостатик извлекается из мембраны при промывке. Гидрофобный край, кроме того, позволяет воздуху проходить через мембрану при ее работе в режиме циклической фильтрации, а это предупреждает образование капель и воздушных пробок.

- Бактериологические анализы пищевых продуктов можно проводить на специальных мембранах, на поверхность которых нанесена сетка из гидрофобного материала (см. разд. 9.7). Таким образом создается множество очень маленьких индивидуальных ячеек. Это необходимо для того, чтобы предотвратить взаимодействие между различными колониями бактерий, образующимися на поверхности мембраны при культивировании, поскольку каждая колония оказывается замкнутой в своей ячейке. При таком устройстве на одном образце мембраны можно получить значительно большее число колоний и уменьшить таким образом количество необходимых разбавлений.

6.9. ПОВТОРНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

Если для потребителя приобретение новой мембраны представляет определенную трудность, можно повторно использовать старую, по крайней мере для проведения бактериологического анализа воды. Повторное использование мембранных фильтров достаточно широко распространено [93]. Мембрану можно использовать от одного до нескольких раз в зависимости от того, насколько аккуратно с ней обращались при работе. Однако вновь используемые мембраны могут работать лишь в той же культуральной среде, из которой они были извлечены. Метод очистки мембранных фильтров для повторного использования описывается Гелдрейхом [81]. Вначале мембрану промывают не менее трех раз в умеренно кипящей воде, затем кипятят в 3 %-ном растворе соляной кислоты в течение нескольких минут и вновь по меньшей мере три раза промывают кипящей водой так, чтобы не осталось и следов кислоты. В качестве индикатора кислотности можно использовать бромкрезоловый красный. Для нейтрализации кислотности в промывную воду добавляют некоторое количество бикарбоната натрия. После пятиминутного кипячения в этой воде мембрана готова к повторному использованию.

Если мембрана приобрела розовую окраску после работы в питательной среде, например в среде Эндо (см. разд. 10.4), то ее можно обесцветить, выдержав в 10 %-ном растворе сульфита натрия, и лишь потом подвергнуть вышеописанной процедуре.

6.10. МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

В предыдущих главах мы уже рассматривали материалы, из которых делают мембраны. В этом же разделе мы дадим перечень соответствующих материалов и приведем их краткую характеристику.

1. *Нитроцеллюлоза*. Этот материал был первым использован для изготовления мембранных фильтров и до сих пор широко используется. Мембраны, сделанные из нитроцеллюлозы, можно применять для самой широкой гаммы фильтруемых жидкостей, в том числе водных систем. Их нельзя применять для анализа на азот при низком содержании азота в выделяемых на этих мембранах веществах, а также при использовании органических растворителей. Большинство нитроцеллюлозных мембран содержит в своем составе разные количества других эфиров целлю-

лозы, обычно ацетилцеллюлозу. Фирма «Шляйхер и Шуль» утверждает, что выпускаемые ею мембраны сделаны из чистой нитроцеллюлозы. Мембраны, изготавливаемые другими фирмами и сделанные, как указывается в технической документации, из смешанных эфиров целлюлозы, состоят главным образом из нитроцеллюлозы. Обычно в технической документации не указывается, содержат ли мембраны наряду с нитроцеллюлозой и другие вещества. Нитроцеллюлозные мембраны и мембраны из смешанных эфиров производятся фирмами «Шляйхер и Шуль», «Майкрофилтрейшн системс», «Оксид», «Сарториус» и «Гелман». Эти мембраны имеются в широком ассортименте с самыми разными размерами пор и могут применяться для проведения большинства бактериологических работ. Они также нашли широкое применение в исследовательских работах с дезоксирибонуклеиновыми кислотами (ДНК) благодаря своей способности сильно связывать одиночные спиральные ДНК.

2. *Ацетилцеллюлоза.* Мембраны из ацетилцеллюлозы имеют такое же широкое применение во многих из тех областей, где используют мембраны из нитроцеллюлозы. Они обладают тем преимуществом, что на них не действуют спирты, поэтому их можно использовать при работе с органическими растворителями на основе спиртов. Эти мембраны особенно полезны в тех случаях, когда содержащиеся в мембране примеси азота могут привести к определенным трудностям. Их нельзя использовать при температурах выше 75 °С. Чистые ацетилцеллюлозные мембраны выпускаются фирмами «Миллипор», «Гелман», «Майкрофилтрейшн системс», «Сарториус» и «Шляйхер и Шуль».

3. *Регенерированная целлюлоза.* Мембраны из регенерированной целлюлозы имеют те же размеры пор и фильтрующие свойства, что и мембраны из эфиров целлюлозы, но устойчивы к действию растворителей, поэтому их можно применять очень широко при фильтрации неводных систем. Правда, они выпускаются не со столь широким диапазоном размеров пор, как эфирцеллюлозные фильтры. Мембраны из регенерированной целлюлозы производят фирмы «Гелман», «Сарториус», «Шляйхер и Шуль» и «Майкрофилтрейшн системс».

4. *Поливинилхлорид.* Мембраны из поливинилхлорида пригодны к использованию в средах, содержащих органические растворители. Они также устойчивы к действию кислот и щелочей средней силы. При температуре 65 °С и выше они размягчаются, поэтому с помощью тепловой сварки нетрудно их закрепить в фильтродержателе. В связи с этим мембраны из поливинилхлорида часто используют при изготовлении фильтр-элементов в виде плоских рамок, цилиндров или каких-либо других полостей. Поливинилхлоридные мембраны делают фирмы «Миллипор» и «Гелман».

5. *Фторуглерод (тефлон)*. Тефлон — торговое наименование политетрафторэтилена (PTFE), выпускаемого фирмой «Дюпон». Мембраны из этого материала стойки к действию сильных органических растворителей, кислот, щелочей и других химических реактивов (за исключением ароматических углеводородов при высоких температурах). Тефлоновые мембраны являются наиболее термостойкими — они сохраняют стабильность в интервале температур от -100°C вплоть до $+300^{\circ}\text{C}$. Тефлоновые мембраны делают методом контролируемого вытягивания плотной тефлоновой пленки (см. гл. 3). Они гидрофобны, и поэтому их нельзя использовать непосредственно для фильтрации водных сред. Чтобы сделать это возможным, их предварительно следует увлажнить метанолом или ацетоном. Поскольку тефлоновые мембраны не пропускают водяные пары, их часто используют для фильтрации газов и в системах воздухообеспечения помещений, которые должны быть стерильными (см. гл. 14). Эти мембраны делают либо без подложек, либо с подложками из полиэтилена. В последнем случае мембраны оказываются более прочными и они легче в обращении. Их поставляют на рынок фирмы «Миллипор», «Гелман», «Сарториус», «Ватман», «Шляйхер и Шуль» и «Майкрофилтрейшн системс», но все они производятся лишь фирмой «У. Л. Гор и К°», запатентовавшей процесс изготовления (см. гл. 3).

6. *Фторуглерод (Дюрапор)*. Фирма «Миллипор» производит также мембраны из фторуглерода, которые изготавливаются методом отливки, а не вытягивания, как в случае тефлоновых мембран. Они называются Дюрапор, и их делают из фторуглеродного полимера¹, несколько отличающегося от тефлона. Имеется также гидрофильный вариант такой мембраны, который получается введением аминовых групп во фторуглеродный полимер. Подробных сведений о технологии производства, а также точный состав материала мембран Дюрапор не сообщается. Одно очевидное преимущество этих мембран заключается в том, что они смачиваются водой даже в отсутствие поверхностно-активных веществ. Мембраны Дюрапор содержат небольшое количество экстрагируемых веществ, обладают низкой токсичностью и слабо связывают белки и ДНК. Они совместимы с растворителями и устойчивы к действию высоких температур при автоклавировании. Фирмой «Миллипор» они рекомендуются для абсолютного извлечения таких частиц, как бактерии; имеются мембраны с размером пор 0,22 и 0,45 мкм.

7. *Акрил*. Акриловые мембраны с подложкой из нейлоновой ткани выпускаются фирмой «Гелман» для использования их

¹ Мембраны Дюрапор изготавливаются на основе поливинилиденфторида.— *Прим. ред.*

при фильтрации фармацевтических препаратов, поскольку эти мембраны не выделяют токсичных веществ.

8. *Полиамид (найлон)*. Мембраны из чистого найлона производит фирма «Пол корпорейшн» для стерилизующей фильтрации. Согласно данным этой фирмы, найлоновые мембраны гидрофильны и, следовательно, не должны содержать в своем составе смачивающих агентов и могут использоваться для фильтрации водных систем. С ними легко обращаться, они гибки и прочны, стойки к действию большинства растворителей, автоклавируются без опасения быть поврежденными и не изменяют своих пропускных характеристик после стерилизации. Полиамидные мембраны производит также фирма «Сарториус».

6.11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В табл. 6.1—6.9 мы даем обзор применения мембранных фильтров и рекомендации по их выбору для тех или иных целей. Отдельные области применения мембран, приведенных в таблицах, более подробно рассматриваются в следующих главах.

Решая вопрос о выборе той или иной мембраны, на ее цену следует ориентироваться в меньшей степени, чем на характеристики, качество и наличие в продаже. Из-за конкуренции, которая имеет место на рынке, цены на мембраны, выпускаемые разными фирмами-изготовителями, мало отличаются друг от друга. В табл. 6.10 приведена краткая сводка цен наиболее широко применяемых мембранных фильтров с размером пор 0,45 мкм и диаметром 47 мм, чтобы читатель мог видеть, как незначительно различие в их ценах.

Таблица 6.1. Мембраны, рекомендуемые для лабораторных исследований

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
Осветление и извлечение частиц из жидкости	1	Эфир целлюлозы
Фильтрация вязких жидкостей	3—8	Эфир целлюлозы
Анализ свободных от азота веществ	0,45	Ацетилцеллюлоза
Извлечение или сбор крупных вирусов и фагов	0,1	Эфир целлюлозы
Фильтрация вирусов ¹⁾	0,025	То же
Извлечение микоплазм	0,1	»
Извлечение и сбор коллоидных осадков	0,1	»
Сверхтонкая очистка для получения	0,1	»

Продолжение

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
реагентов, используемых в методах светорассеяния		
Сверхтонкая очистка растворителей для ВЭЖХ	0,5	Тефлон, регенерированная целлюлоза
Стерильная фильтрация водных систем	0,2	Эфир целлюлозы, нейлон
Стерильная фильтрация неводных систем	0,2	Тефлон, регенерированная целлюлоза
Стерилизующая фильтрация спиртовых растворов	0,2	Ацетилцеллюлоза
Извлечение бактерий	0,45	Эфир целлюлозы
Аналитическое отделение осадка	0,65	То же
Разделение водных суспензий		Нуклепор
Гравиметрический анализ промышленных гидравлических жидкостей	5	Эфир целлюлозы
Стерилизация вентиляционного воздуха в помещениях	0,2	Тефлон
Фильтрация органических растворов и растворителей		Регенерированная целлюлоза
Стерилизация агрессивных жидкостей	0,2	Тефлон
Осветление агрессивных жидкостей	1	»
Стерилизация воздуха и газов	0,2	»
Анализ радиоактивных частиц		Эфир целлюлозы

¹⁾ Имеется в виду концентрирование мелких вирусов и фагов. На наш взгляд данные табл. 6.1 — 6.9 носят весьма приблизительный характер. Например, мембраны Нуклепор, выпускаемые с размерами пор в диапазоне 0,03 — 8 мкм, могут использоваться практически для всех целей, регламентируемых этой таблицей. — Прим. ред.

Таблица 6.2. Мембраны для микробиологических анализов воды

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мм	Материал мембраны
Концентрирование вирусов	0,1	Нитроцеллюлоза
Общий подсчет бактерий	0,2	Эфир целлюлозы
Подсчет БГКП	0,45	То же
Подсчет ФКП	0,7	Эфир целлюлозы (анизотропный)
Извлечение фитопланктона для анализа	1—3	Эфир целлюлозы
Общее извлечение частиц из суспензий для анализа	5	То же
Извлечение тонких осадков для анализа	0,45	»
Анализ питательной котловой воды на содержание в ней частиц оксида железа	0,45	Эфир целлюлозы (с нанесенной счетной сеткой)

Таблица 6.3. Мембраны для анализа загрязненного воздуха

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
Разделение разных по размерам частиц, содержащихся в воздухе	0,4—8	Нуклепор
Обычный отбор проб из воздуха	0,8	Эфир целлюлозы
Определение содержания вирусов в воздухе	0,2	Нитроцеллюлоза
Выделение содержащихся в воздухе частиц для последующего микроскопического анализа	0,45	Нитроцеллюлоза (зеленая мембрана с нанесенной сеткой)
Выделение слабоокрашенных частиц для последующего микроскопического анализа	0,45	Нитроцеллюлоза (черная мембрана с нанесенной сеткой)
Контроль на содержание волокон асбеста (метод NIOSH)	0,8	Нитроцеллюлоза
Контроль содержания капель масла в тумане (метод NIOSH)	0,8	То же
Количественное выделение респираторной пыли	1	»
Контроль содержания частиц в горячих газах	0,8	Ацетилцеллюлоза
Выделение хлопковой пыли для гравиметрического анализа	0,5	Нитроцеллюлоза
Выделение влажных частиц для последующего анализа	1	Эфир целлюлозы
Контроль содержания аэрозолей	3	Тефлон
Контроль биологически опасных компонентов выхлопов двигателей	0,2	Эфир целлюлозы

Таблица 6.4. Мембраны для контроля качества пищевых продуктов и напитков

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
Подсчет бактерий	0,2	Эфир целлюлозы
Подсчет БГКП	0,45	То же
Определение БГКП в молоке	0,65	»
Выделение дрожжей и плесенных грибов для подсчета колоний	0,65	»
Выделение дрожжей и плесенных грибов для микроскопического анализа	0,8	»

Таблица 6.5. Мембраны для испытаний на стерильность

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
Фармацевтические и косметические средства, не содержащие бактериостатиков	0,2 0,45	Эфир целлюлозы То же
Фармацевтические и косметические средства, содержащие бактериостатики	0,2 0,45	Эфир целлюлозы Эфир целлюлозы (с гидрофобным краем)
Мази и пасты, не содержащие бактериостатиков	0,3 0,45	Эфир целлюлозы
Мази и пасты, содержащие бактериостатики	0,3 0,45	То же Эфир целлюлозы (с гидрофобным краем)

Таблица 6.6. Мембраны для цитологических исследований и хемотаксиса

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм	Материал мембраны
Выделение человеческих клеток для послойного цитологического анализа	1—5	Эфир целлюлозы
Камеры для хемотаксиса (изучение миграции клеток под действием химических «приманок»)	3—12	То же Нуклепор

Таблица 6.7. Мембраны из эфиров целлюлозы для стерилизации культуральных сред методом последовательной фильтрации

Область применения	Рекомендуемые размеры пор, мкм
Грубая или предварительная фильтрация	0,8—1
Тонкая фильтрация	0,45
Окончательная фильтрация	0,3
Стерилизующая фильтрация	0,2
Извлечение микоплазм	0,1
Предварительная фильтрация сыворотки	1

Таблица 6.8. Мембраны для биомедицинских и клинических химических исследований

Область применения	Рекомендуемый размер пор, мкм	Материал мембраны
Подсчет клеток в воде, идущей на приготовление лекарств	0,8	Эфир целлюлозы
Связывание РНК и ДНК	0,45	Нитроцеллюлоза
Связывание белков	0,45	»
Отделение несвязанных белков от связанных	0,45	Ацетилцеллюлоза
Радиоиммунологические исследования (отделение связанных с антителами антигенов от свободных антигенов)	0,45	»
Выделение белков из воды	0,025	Нитроцеллюлоза
Флюоресцентный анализ антител	0,45	Нитроцеллюлоза (черная мембрана)
Полупроницаемые перегородки в диффузионных камерах ¹⁾	0,6	Поливинилхлорид

¹⁾ Рекомендуются также мембраны Нуклепор с размерами пор 0,2 и 0,4 мкм: — Прим. ред.

Таблица 6.9. Мембраны общепромышленного назначения и для производства лекарственных средств

Область применения	Рекомендуемый размер пор, мкм	Материал мембраны
Стабилизация пива	1,2	Эфир целлюлозы
Стабилизация вин и соков	0,8	То же
Окончательная фильтрация напитков	1	Ацетилцеллюлоза (ни в коем случае не нитроцеллюлоза)
Сверхтонкая очистка воды	0,45	Эфир целлюлозы
	1,2	
Сверхтонкая очистка спиртов	1	Ацетилцеллюлоза
Стерилизующая фильтрация спиртовых растворов	0,2	»
Осветление фоторезистов	10	Тефлон
Осветление концентрированных кислот и щелочей	10	»
Осветление прочих реактивов и коррозионно-активных жидкостей	10	»
Осветление ракетных топлив и криогенных веществ	10	»
Производство полупроводников	0,2	Ацетилцеллюлоза
Осветление вакцин	0,45	Эфир целлюлозы
Стерилизующая фильтрация вакцин	0,2	То же
Производство различных растворов для внутривенного введения	0,2	»
Фильтрация гидравлических жидкостей	0,8	Ацетилцеллюлоза

Таблица 6.10. Сравнительные цены одностипных мембранных фильтров производства различных фирм

Название или материал мембраны	Фирма	Относительная цена
НAWP	«Миллипор»	1,32
Тиран-М/Е	«Пюропор»	1,42
WCN	«Ватман»	1,14
Поликарбонат	«Нуклепор»	1,37
Смесь эфиров	«Нуклепор»	1,11
Нитроцеллюлоза	«Майкрофилтрейшн стемс»	си- 1,00
Нитроцеллюлоза	«Шляйхер и Шуль»	1,32
Смесь эфиров	«Гелман»	1,13
Ультипор	«Пол»	1,26
Нитроцеллюлоза	«Сарториус»	1,09

Цены приведены относительно наименьшей. Сравнение сделано на основе последних цен за упаковку из 100 мембран с размером пор 0,45 мкм (нестерильных, белых, без подложек). Приведенные цены могут меняться со временем и, кроме того, могут иметь место определенные скидки.

«Стерильность нельзя ввести в готовый продукт; ее следует обеспечивать в процессе получения этого продукта».

(Всемирная организация здравоохранения)

Глава 7

Стерилизация и процесс мембранной фильтрации

7.1. ВВЕДЕНИЕ

В промышленной практике и при производстве лекарственных средств фильтрации подвергаются большие объемы жидкости. Если при этом целью является стерилизация продукта, то процесс называется *стерилизующей фильтрацией* или *фильтрационной стерилизацией*. Под стерильностью мы понимаем полное отсутствие жизнеспособных микроорганизмов. Во многих случаях процесс фильтрации представляет собой наилучший способ стерилизации жидкостей. Фильтрацию для стерилизации продукта используют в тех случаях, когда его нельзя подвергать тепловой обработке или другим сильным воздействиям. Фильтрационную стерилизацию часто применяют в фармацевтической промышленности. Многие из лекарств должны выпускаться в стерилизованном виде, но, если они чувствительны к действию высоких температур, их нельзя подвергать автоклавированию. Фильтрационная стерилизация широко применяется также в производстве пищевых продуктов и напитков, где во избежание каких-либо изменений в их цвете или вкусе ее проводят наряду с тепловой обработкой. Даже в тех случаях, когда к продукту не предъявляются требования бактериологической чистоты, стерилизующую фильтрацию проводят для удаления тех частиц, присутствие которых в продукте нежелательно и размеры которых близки или равны размерам бактерий. Мембранная фильтрация жидкостей для удаления бактерий стала общепринятой в электронной, аэрокосмической и химической промышленности.

В настоящей главе мы рассмотрим некоторые методы и приемы использования мембранных фильтров в промышленности и при изготовлении лекарственных препаратов. Мы расскажем также о технике стерилизации мембран. В гл. 14 мы коснемся другой важной сферы применения стерилизующей фильтрации, а именно использования ее для очистки воздуха.

Главным требованием, которое предъявляется к стерилизующим мембранам, является удаление из фильтруемой жидкости всех жизнеспособных микроорганизмов. В большинстве случаев это требует применения мембран с номинальным размером пор 0,2 мкм. Однако существуют несколько типов бактерий, например определенные виды микоплазм, которые достаточно малы и настолько гибки, что проникают сквозь мембраны с размерами пор 0,2 мкм. Поэтому для их задержки требуются мембраны с размерами пор 0,1 мкм. Но, поскольку производительность таких мембран намного меньше, их применяют лишь в специальных случаях.

То, насколько хорошо стерилизующая фильтрация выполняет свои функции, зависит частично от метода испытаний на выживаемость бактерий. Фармакопея США, разрабатывающая руководства для фирм, производящих лекарственные препараты, предписывает для проведения испытаний на стерильность использовать несколько различных типов культуральных сред (см. разд. 7.12). Если живой микроорганизм, присутствующий в фильтрате, окажется неспособным к росту в одной из них, этот факт может не вызвать подозрений и жидкость будет ошибочно считаться стерильной. Не будет сильным преувеличением сказать, что стерильность — это *не* абсолютная характеристика, а лишь то, что можно установить при помощи анализов.

Связь точек пузырька со свойствами мембранных фильтров по задержке бактерий. Исследования, выполненные Рети и др. [177], а также Сладеком и Лихи [197], позволили выработать некоторые общие принципы для решения вопроса о размерах пор мембран в стерилизующей фильтрации. Эти авторы сравнивали мембраны, имеющие различные диаметры пор, по их способности задерживать бактерии, которые определялись через значения точек пузырька. Задержка бактерий характеризовалась параметром, называемым *логарифмическим показателем снижения* (ЛПС), который равен отношению десятичных логарифмов числа микроорганизмов в фильтруемой жидкости и числа микроорганизмов, прошедших сквозь мембрану. При использовании мембраны с размерами пор 0,2 мкм ЛПС достигает 10, т. е. максимального значения, которое может быть получено при проведении испытания с указанной мембраной. Значение ЛПС, равное 10, означает, например, что 10^{10} бактерий остаются на мембране, а 10 бактерий проходит сквозь нее в фильтрат. Как видно из рис. 7.1, имеется прямая связь между размером пор мембран и ЛПС (эта зависимость была также подтверждена Джонстоном и Мельцером [118]).

Из этого рисунка следует, что, если содержание бактерий в фильтруемой жидкости мало, стерилизующую мембрану можно выбрать с более крупными порами, а это позволило бы

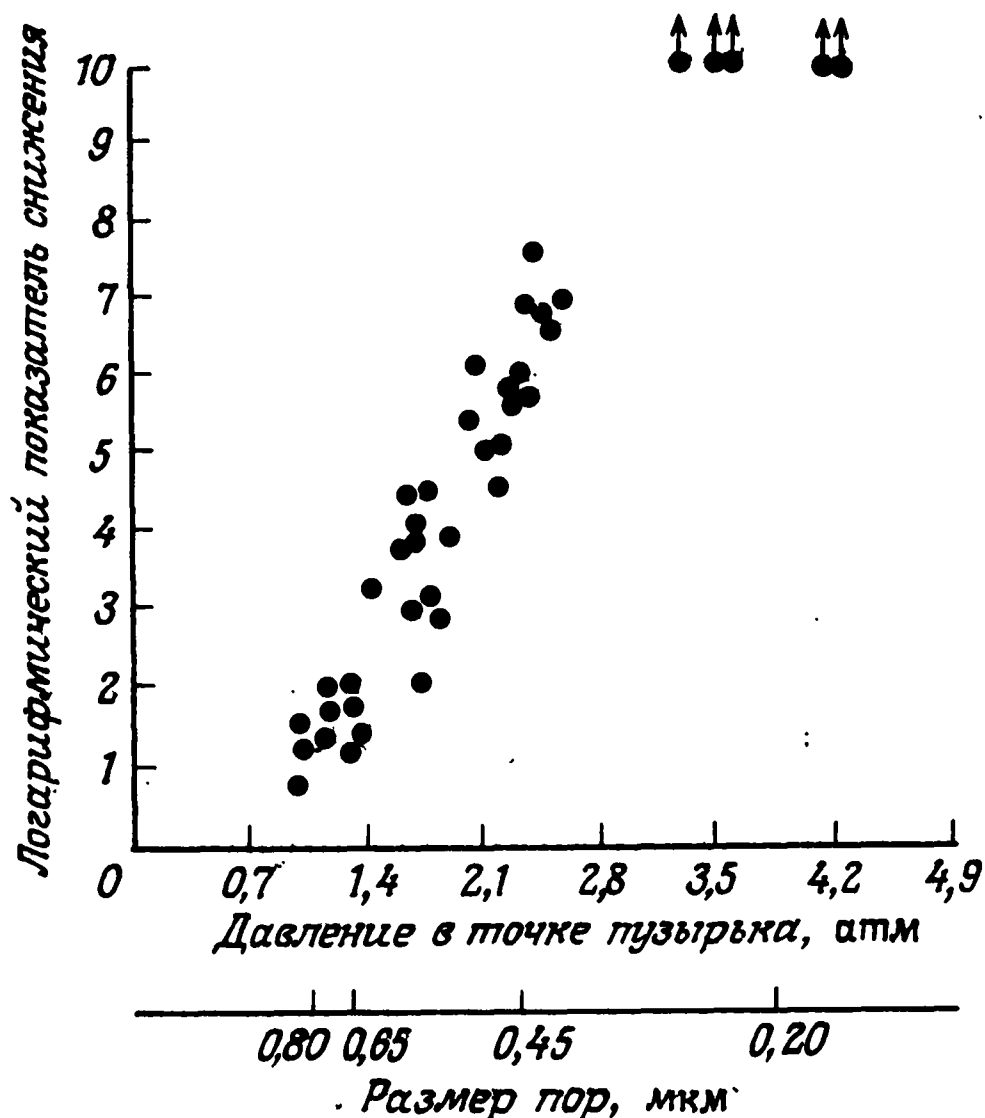


Рис. 7.1. Влияние размера пор мембран на прохождение бактерий *Pseudomonas diminuta*. Точки со стрелками характеризуют отсутствие прохождения. (Займствовано из работы [197].)

повысить скорость фильтрации. Действительно, для некоторых фильтруемых жидкостей можно достигнуть стерилизации, используя мембраны с размерами пор более 0,45 мкм, что дает большой выигрыш во времени и в стоимости мембраны (поскольку в этом случае из-за более низкой скорости забивания мембрана может иметь меньшую площадь поверхности). А с другой стороны, следует ли вообще использовать мембраны с диаметром пор 0,1 мкм? Это возможно, но только в случае небольших объемов фильтруемой жидкости. Жизнеспособные микроорганизмы столь малых размеров редко содержатся в жидкостях, подлежащих стерилизующей фильтрации. С практической же точки зрения скорости фильтрации через мембраны с порами размером 0,1 мкм настолько низки, что такую фильтрацию приходится проводить необычайно долго. Если наблюдается прохождение жизнеспособных организмов через мембрану с порами размером 0,2 мкм, то может оказаться экономически более выгодной доочистка фильтрата¹.

7.2. СТЕРИЛИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

Поскольку одна из главных областей применения мембранных фильтров — это стерилизация жидкостей, способность самих мембран к стерилизации является их важным свойством.

¹ То есть повторение процесса микрофильтрации через другой образец мембраны с теми же номинальными размерами пор. — Прим. ред.

Устойчивость мембраны различного химического состава к действию тепловой и химической стерилизации оказывается существенно разной. Поэтому в каждом конкретном случае важно знать, какой из возможных способов стерилизации подходит лучше всего. При использовании мембран для анализа качества воды часто сталкиваются с тем, что в зависимости от способа стерилизации мембраны меняется и ее способность извлекать из воды микроорганизмы. Эту проблему мы рассмотрим в разд. 10.6.

Автоклавирование. Мембранные фильтры часто продаются в стерильных упаковках, но в большинстве случаев потребитель может простерилизовать мембраны самостоятельно. Многие мембранные фильтры можно автоклавировать при температуре 121 °С и давлении 1,5 атм в течение 15 мин. При этом каждую мембрану рекомендуется положить между двумя кусками фильтровальной бумаги, завернуть всю упаковку в бумагу и в таком виде поместить в автоклав. Некоторые фирмы продают так называемую «упаковку для автоклавирования», в которой нестерилизованные мембраны упаковываются таким образом, чтобы их можно было автоклавировать непосредственно (как правило, в упаковке содержится 10 мембран, переложенных адсорбирующими мягкими прокладками). Фирма «Гелман компани» продает мембраны в упаковках для автоклавирования, имеющих вид конвертов, у которых после автоклавирования меняется цвет краев, что указывает на завершение процесса.

Возможно также проведение автоклавирования мембраны уже после ее помещения в фильтродержатель. Если требуется осуществить небольшое число filtrаций, то мы рекомендуем осуществлять стерилизацию именно таким образом. Мембрану помещают в фильтродержатель и лишь слегка уплотняют ее в нем. Для защиты мембраны под нее кладут кусок фильтровальной бумаги. Затем фильтродержатель с мембраной заворачивают в бумагу и подвергают автоклавированию. Непосредственно перед употреблением мембрану тщательно уплотняют в фильтродержателе. Осуществлять стерилизацию мембран подобным образом рекомендуется в тех случаях, когда стерилизующую фильтрацию необходимо провести не в лаборатории, а, скажем, в полевых условиях.

При автоклавировании мембран важно выбрать правильно время, затрачиваемое на эту операцию. Крупногабаритные устройства следует стерилизовать дольше, чем небольшие, при этом внутри устройств не должно оставаться воздуха. Устройство, предназначенное для работы под давлением, можно стерилизовать текущим паром, но прежде его следует вакуумировать, чтобы удалить оставшийся в нем воздух. С учетом возможных изменений мембраны в результате автоклавирования длитель-

ность операции должна быть как можно короче. За информацией по автоклавированию различных мембран следует обращаться к технической документации соответствующих фирм-изготовителей.

В случае когда имеется предварительно стерилизованная мембрана, фильтродержатель желательно автоклавировать в несобранном виде, а затем собирать его в асептических условиях. Мембрану следует брать пинцетом, кончики которого были простерилизованы в пламени спиртовки.

Автоклавирование оказывает определенное влияние на свойства мембраны. Даубнер и Петер [57] показали, что мембраны из нитроцеллюлозы при этом деформируются; несколько уменьшаются их толщина и диаметр, а также размеры пор, например с 0,28 до 0,25 мкм. Мембраны из ацетилцеллюлозы более устойчивы к автоклавированию, чем мембраны из нитроцеллюлозы или из смеси эфиров целлюлозы. Если нитроцеллюлозные мембраны следует стерилизовать при температурах, не превышающих 121 °С в течение не более 20—30 мин, то мембраны из ацетилцеллюлозы можно автоклавировать при температурах на 7—10 градусов выше в течение времени до 65 мин, причем в этих условиях каких-либо существенных изменений у них не наблюдается. Если в каких-то конкретных случаях нужно знать точно размеры пор мембран, то после автоклавирования в ответственных случаях необходимо выполнить специальные определения этих размеров. Мембраны из ацетилцеллюлозы, в отличие от нитроцеллюлозных, можно автоклавировать повторно. Если уже собранную фильтровальную установку подвергли автоклавированию, но не использовали сразу же для фильтрации, ее можно хранить в течение нескольких дней в асептических условиях, однако больше недели этого делать не рекомендуется. Повторному автоклавированию можно подвергнуть уже собранную установку с мембраной из ацетилцеллюлозы, но, если используется мембрана из нитроцеллюлозы, установку следует разобрать, поставить новую мембрану, после чего подвергнуть ее повторной стерилизации.

Сухожарная стерилизация. Для стерилизации мембран из ацетилцеллюлозы или тефлона (но не из нитроцеллюлозы или нейлона) их можно подвергнуть горячей сушке при температуре 180 °С в течение двух часов. Можно также стерилизовать мембраны текучим паром при атмосферном давлении. Для того чтобы все споры погибли, рекомендуется последовательная пропарка мембраны в течение трех дней по 20 мин в день.

Химическая стерилизация. Большинство мембран можно стерилизовать окисью этилена. Такую стерилизацию осуществляют фирмы, которые продают мембраны в стерильной упаковке. Окисью этилена можно стерилизовать черные и зеленые мем-

браны, применяемые в специальных целях, которые нельзя подвергать автоклавированию из-за воздействия тепла на краситель. При стерилизации окисью этилена в лабораторных условиях мембрану следует разместить на соответствующей поверхности в стерилизационной камере и на каждый литр объема этой камеры ввести 0,5 мл окиси этилена; реакция должна протекать в течение примерно трех часов. Как указывают Даубнер и Петер [57], стерилизация окисью этилена — один из лучших методов стерилизации мембран, не оказывающий на них какого-либо нежелательного воздействия. Однако некоторое небольшое количество этиленгликоля все же удерживается внутри мембраны, и его следует обязательно удалять, если он может как-то воздействовать на фильтрат.

Другим химическим агентом, который можно применять для стерилизации, является формальдегид. Его используют для мембран, хранящихся во влажном состоянии (например, в случае регенерированной целлюлозы). Стерилизацию проводят, выдерживая мембрану в течение 24 ч в 2 %-ном растворе формальдегида с последующим удалением его из мембраны промывкой в течение некоторого времени стерильной водой.

Радиационная стерилизация. Мембраны можно также стерилизовать ультрафиолетовым светом. Это один из тех методов стерилизации, который практически не воздействует на мембрану и гарантирует ее абсолютную стерильность. Для достижения стерильности вполне достаточно облучения *обеих* сторон мембраны с помощью стандартной бактерицидной лампы ультрафиолетового света с расстояния 50 см в течение 20—30 мин. При этом каких-либо изменений размеров пор или механических характеристик мембраны даже посредством весьма точных измерений установить не удастся.

7.3. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ФИЛЬТР-ПАТРОНОВ

Стерилизацию фильтр-патронов осуществляют, как правило, непосредственно на месте, пропуская через систему пар. На патронах, которые предназначены для целей стерилизующей фильтрации, имеются пометки о том, можно ли их пропаривать повторно. При поднятии давления в системе температура внутри патрона растет до значений, необходимых для его стерилизации; пропаривание следует проводить достаточно долго, чтобы быть уверенным в полной стерильности фильтр-патрона.

Следует помнить, особенно в случае стерилизации фильтр-патронов, что при тепловой обработке важную роль играют как *температура* стерилизации, так и *время*, в течение которого эту температуру выдерживают. Конструкция и размеры этих уст-

ройств таковы, что их внутренние части прогреваются медленно. Поэтому приходится прибегать к компромиссу, поскольку при высоких температурах могут разрушаться отдельные компоненты системы, а длительное время может оказаться неприемлемым с точки зрения самого процесса. Как правило, при тепловой стерилизации происходит большая *передержка в режимах инактивации*, поскольку невозможно точно определить необходимые температуру и время для обеспечения стерильности.

Нелегко также установить, действительно ли при выбранных значениях температуры и времени стерилизовалась вся патронная система. Проверить стерильность отдельной мембраны нетрудно, но определить стерильность большой патронной системы, вообще говоря, невозможно. Фирмы, производящие мембранные фильтры, обычно указывают, при каких значениях температуры и времени нужно стерилизовать их изделия, и если этим рекомендациям следовать, то никаких специальных проверок на стерильность проводить нет необходимости.

Повторные стерилизации фильтр-патронов паром в конце концов приводят к их порче. Здесь важно не то, сколько раз подвергали мембрану стерилизации, а то, в течение какого времени она выдерживалась при данной температуре. Например, фирма «Пол» для своих мембранных фильтров из нейлона установила, что при температуре 125 °С их можно выдерживать в общей сложности в течение 50 ч, а при 145 °С — лишь в течение 10 ч. После каждой стерилизации следует проводить испытания мембраны по методу точки пузырька, с тем чтобы убедиться в ее целостности (см. разд. 4.2 и 7.4).

Для стерилизации фильтр-патронов (как разборных, так и капсульного типа) фирмы-изготовители применяют также ионизирующее излучение.

7.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦЕЛОСТНОСТИ МЕМБРАНЫ МЕТОДОМ ТОЧКИ ПУЗЫРЬКА

В разд. 4.2 был описан метод точки пузырька как стандартный способ определения размеров пор мембраны. Метод точки пузырька, являясь неразрушающим способом установления целостности фильтрационной системы [185, 160], имеет также большое значение в стерилизующей фильтрации. Испытания по этому методу проводят непосредственно перед проведением процесса фильтрации и сразу же после него. Если первое испытание показывает, что мембрана не удовлетворяет техническим условиям, то ее применять не следует. Если же первое испытание проходит нормально, но после завершения фильтрации при проверке мембраны методом точки пузырька оказывается, что

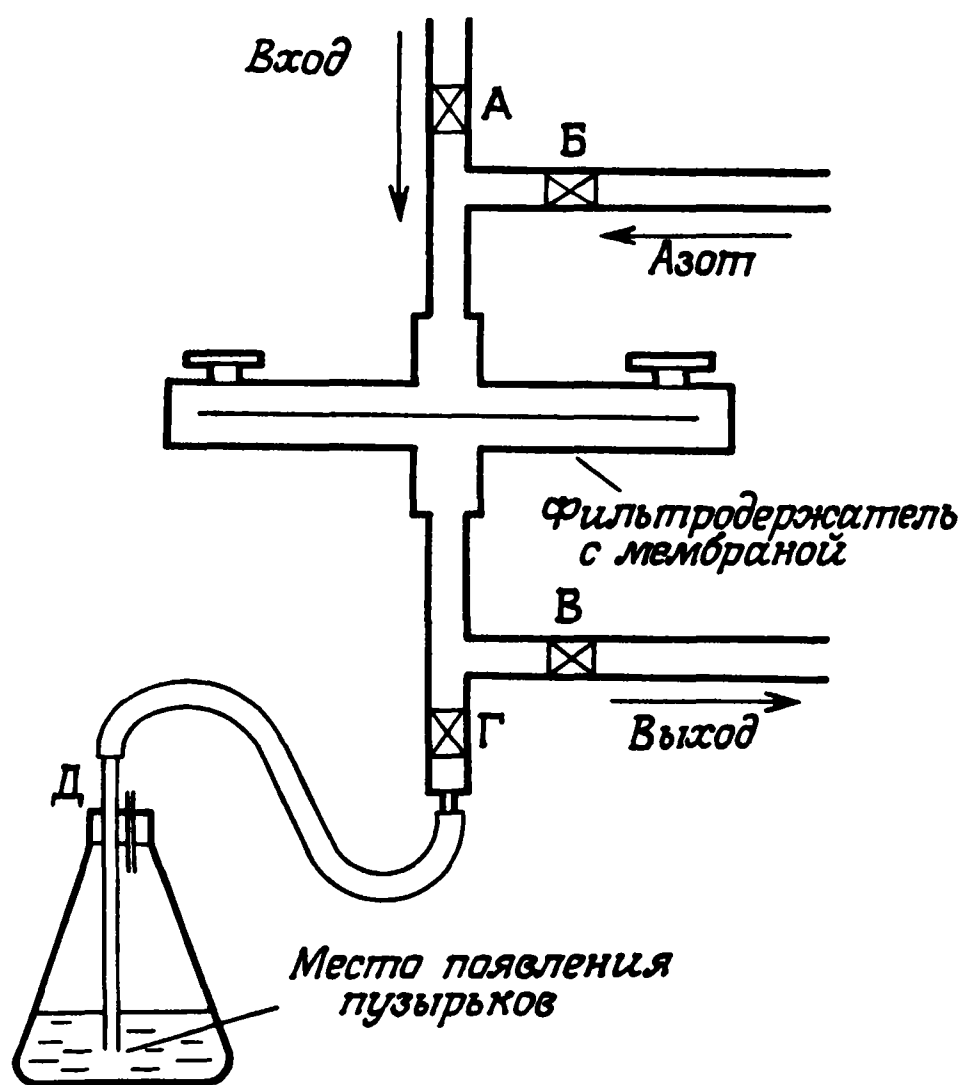


Рис. 7.2. Схема фильтрационной установки для испытания стерилизующей мембраны по методу точки пузырька. До начала проведения испытаний вся установка и подводящие трубки подвергаются стерилизации. Затем закрывают вентили Б и Г, открывают вентили А и В и увлажняют мембрану. Воздушный клапан на самом фильтродержателе можно использовать для сброса увлеченного воздуха. Затем закрывают вентили А и В и трубку Д вставляют в стерильную приемную колбу. После этого открывают вентили Б и Г, причем за счет подачи воздуха через вентиль Б в системе повышается давление до 1,4 атм. Оставшаяся на мембране жидкость будет проходить в емкость, увлекая за собой небольшое количество воздуха, скопившегося у нижней стороны мембраны. После этого начинают медленно повышать давление перед мембраной, тогда на конце трубки Д возникает непрерывное пузырение. Значение давления, при котором появляются первые пузырьки, и есть точка пузырька. Когда точка пузырька найдена, вентиль Б перекрывают, а избыточное давление сбрасывают. При этом перекрывают также вентиль Г, открывают вентиль А, так что стерилизуемая жидкость поступает в фильтродержатель. При этом с помощью воздушного клапана на фильтродержателе спускают воздух, который попал в систему. Затем открывают вентиль В и начинают фильтрацию. (Рисунок заимствован из работы [155].)

технические условия не удовлетворяются, это свидетельствует о нарушении целостности мембраны в процессе фильтрации и нельзя быть уверенным в стерильности полученного продукта. При этих обстоятельствах весь процесс фильтрации следует повторить с новым фильтр-патроном.

На рис. 4.1 была изображена типичная установка для проверки дисковой мембраны методом точки пузырька. В случае стерилизующей фильтрации эту установку необходимо модифицировать таким образом, чтобы испытания по методу точки пу-

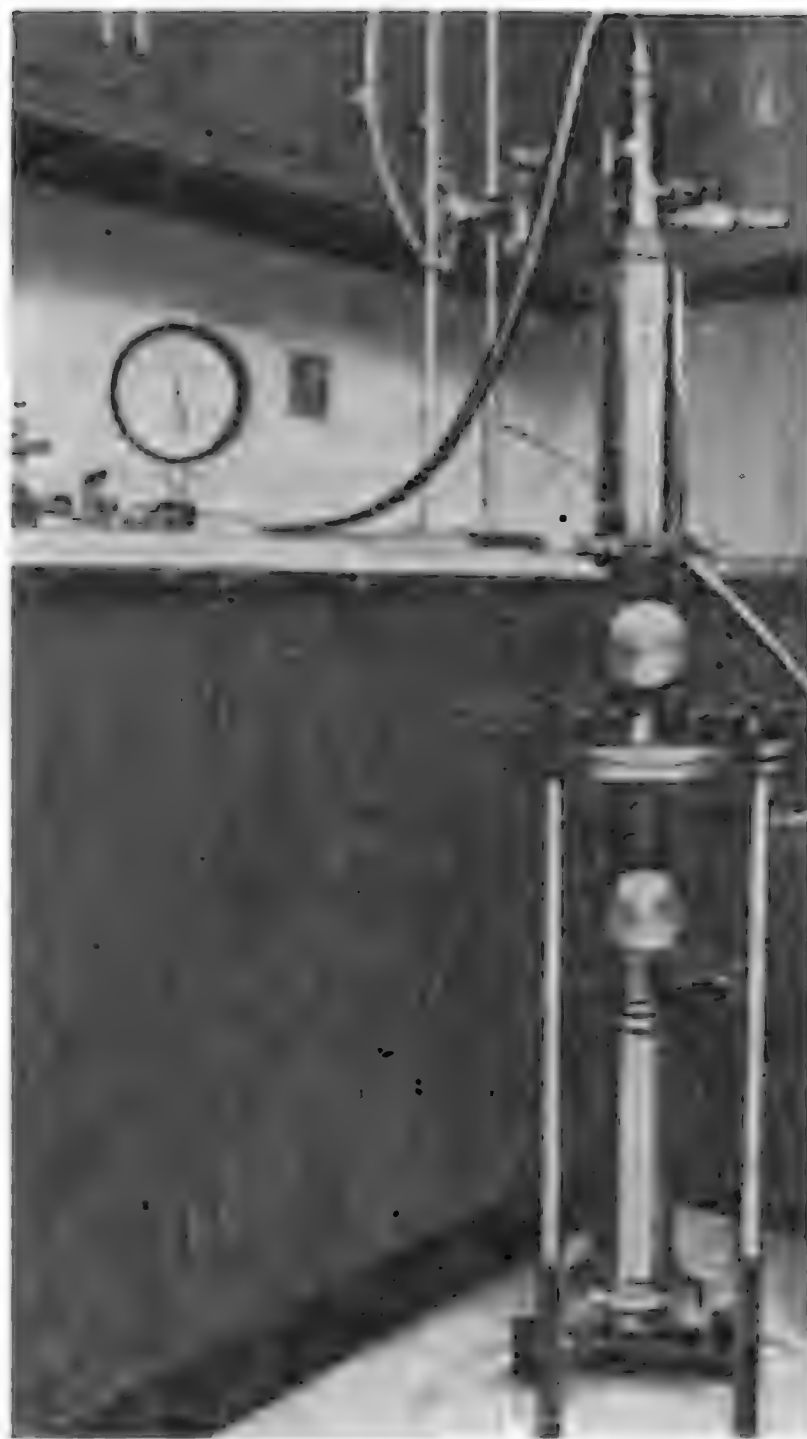


Рис. 7.3. Общий вид установки, используемой для определения точки пузырька фильтр-патрона. (С разрешения фирмы «Миллипор корпорейшн».)

зырька можно было проводить в асептических условиях. На рис. 7.2 показана схематически такая установка для испытаний дисковой мембраны, а на рис. 7.3 — для испытаний фильтр-патрона.

Олсон [160] довольно подробно рассмотрел конкретные проблемы, возникающие при испытаниях на целостность фильтровальных систем с большой площадью поверхности. Он отметил, что для проверки таких систем метод точки пузырька оказывается ненадежным вследствие диффузии газа (см. разд. 4.2). Олсон приводит описание автоматических устройств для измерения диффузии таких, как выпускаемый фирмой «Пол» измеритель методом прямой подачи, автоматический измеритель диффузии фирмы «Миллипор» и Сарточек 1000 фирмы «Сартorius». Последнее устройство, как отмечает Олсон, имеет уникальное значение для проверки целостности мембран, предназначенных для установок большой производительности, поскольку в этом устройстве предусмотрено построение непрерывной кривой, характеризующей давление газа на входной

(нестерильной) стороне влажной мембраны. Автоматическая система с обратной связью определяет, как изменяется давление на входе системы — увеличивается, остается на прежнем уровне или уменьшается. Если мембрана порвана или смочена только частично, давление будет расти неравномерно. Наряду с проверкой целостности мембраны автоматическое устройство Сартчек 1000 позволяет провести также испытание относительно того, способна ли мембрана держать давление на заданном уровне. Как считает Олсон [160], Сартчек 1000 действует на основе принципов, находящихся в полном соответствии с нашими современными представлениями о механизме работы мембраны.

7.5. ФИЛЬТРАЦИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ

В качестве примера стерилизующей фильтрации рассмотрим вначале методы, используемые в случае стерилизации культуральных сред, содержащих сыворотку крови. При этом следует заметить, что в этом случае фильтрация широко используется для стерилизации, но здесь возникают неожиданные проблемы. Поскольку белки в сыворотке крови легко денатурируются при вспенивании, необходимо избегать фильтрации под вакуумом. Кроме того, если фильтрацию проводить при давлении выше 0,8 атм, возможна денатурация сывороточных белков на поверхности мембранного фильтра. Следовательно, фильтрационную систему нужно выбирать таким образом, чтобы она имела не только высокую производительность, но и не оказывала отрицательного влияния на качество фильтрата. Величина перепада давления при фильтрации не должна превышать 0,15—0,35 атм. Когда скорость потока жидкости начинает падать, поднимать давление нельзя, поскольку это может привести к забиванию мембраны и как следствие к образованию вблизи ее поверхности липидно-белкового гелевого слоя, что приведет к дальнейшему снижению удельной производительности мембраны. В случае фильтрации под давлением не следует использовать сжатый воздух, так как это может вызвать окисление компонентов жидкости — лучше использовать азот.

Некоторые фирмы предлагают специальный тип мембранного фильтра, предназначенного для фильтрации культуральных сред. Эти мембраны, часто помечаемые буквами ТС, специально делают с низким содержанием экстрагируемых водой веществ. При этом исключается загрязнение конечного продукта смачивающим агентом или другими органическими веществами, экстрагируемыми из материала мембраны. Однако мембраны ТС

смачиваются хуже обычных, так что необходимо тщательно следить за тем, чтобы смачивание было полным.

Культуральные среды готовят смешением концентрированного сбалансированного солевого раствора с химически чистой водой¹ и предварительно профильтрованной сывороткой крови. Здесь следует руководствоваться понятием «чистоплотность»: исходя из чистых реагентов, можно получить *ультрачистый* продукт.

На рис. 7.4 представлена схема установки для проведения стерилизующей фильтрации в рассматриваемом нами случае. Заметим, что компоненты реакционной смеси, включая газ для создания давления, предварительно фильтруют в смесительном устройстве, откуда они поступают для фильтрации через стерилизующую мембрану и затем в приемное устройство. Во избежание денатурации, о чем упоминалось выше, создается небольшое избыточное давление, а пропускание растворов исходных веществ через предфильтры исключает происходящее обычно и при низких давлениях забивание мембран.

Сыворотку крови необходимо фильтровать отдельно через набор градуированных мембран. Заметим, что такую группу мембран не следует автоклавировать, поскольку воздушные пробки, которые могут образовываться при этом, будут уменьшать эффективную площадь фильтрации. (В конечном счете сыворотка окажется стерилизованной после смешения с солевым раствором.) Прежде чем использовать этот набор мембран, их необходимо проверить методом точки пузырька; полученная при этом точка пузырька должна иметь значение, соответствующее мембране из используемого набора с наименьшим размером пор. По завершении всего процесса фильтрации определение точки пузырька следует повторить; полученное вновь значение точки пузырька должно равняться установленному ранее.

Фильтрацию сыворотки и плазмы крови можно осуществить значительно более эффективно, если принять меры против гемолиза или преждевременного свертывания крови в ходе процесса ее сбора и разделения на фракции. Стеклопосуда, в которую собирают кровь, должна быть химически и биологически чистой и свободной от частиц, которые могут усилить разрушение тромбоцитов. Желательно, чтобы посуда для сбора крови была силиконизирована с целью уменьшения вероятности свертывания крови или плазмы. Кроме того, во избежание гемолиза посуда должна быть совершенно сухой. В шприцах необходимо применять иглы достаточно большого диаметра, чтобы обратное давление в шприце было минимальным. Однако

¹ Для приготовления культуральных сред используют воду специального качества (так называемую *апирогенную воду*).— Прим. ред.

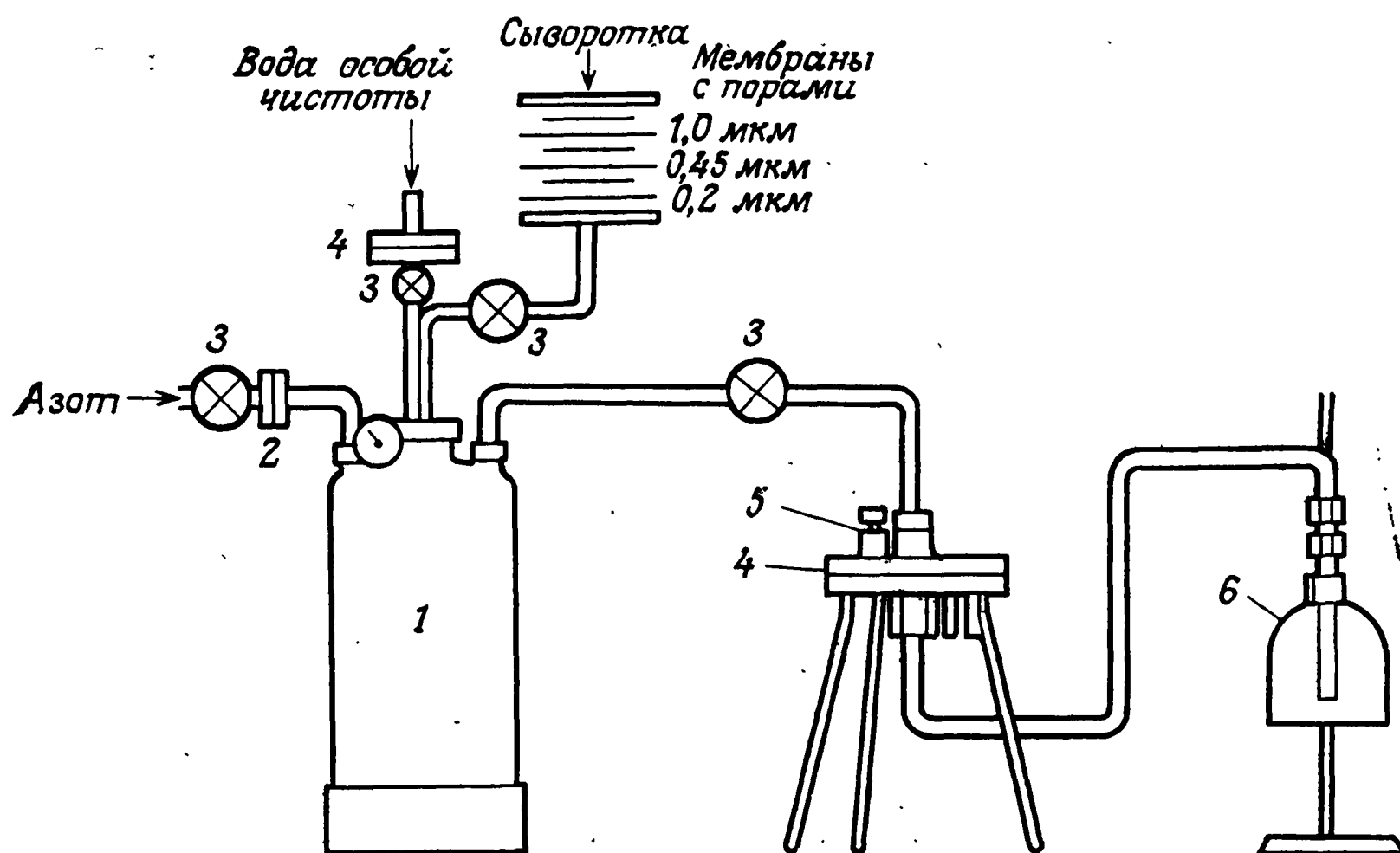


Рис. 7.4. Установка, рекомендуемая для стерилизующей фильтрации содержащей сыворотку культуральной среды. (В основу положена схема, предложенная фирмой «Майкрофилтрейшн системс».) 1 — культуральная среда (сбалансированный солевой раствор); 2 — тефлоновая мембрана с порами 0,5 мкм; 3 — кран; 4 — мембрана с порами 0,2 мкм; 5 — воздушный клапан; 6 — колпачок для стерильного розлива.

диаметр игл не должен быть слишком большим, чтобы внутри иглы не образовывались завихрения, которые могут вызвать гемолиз. Следует избегать образования в шприце пузырьков, поэтому плунжер шприца нужно двигать медленно, без резких нажатий на него и остановок. Разрежение, создаваемое в шприце, должно быть по возможности минимальным. Прежде чем использовать сыворотку или плазму крови, необходимо дать крови возможность полностью свернуться, чтобы все ее клетки оказались в сгустке. После центрифугирования сыворотку необходимо проверить на присутствие эритроцитов; если они там есть, их следует удалить предварительной фильтрацией через стекловолоконный фильтр. Во избежание роста бактерий сыворотку необходимо профильтровать как можно быстрее и по возможности сразу же заморозить. При необходимости использования ее следует быстро разморозить при температуре 35—37 °С. Остаточный фибрин можно извлечь фильтрацией через марлю или стекловолокно.

Фильтруемость крови определяется источником, от которого она получена; кровь одних животных фильтруется легче, чем других. Ниже приведен перечень источников в порядке облегчения фильтруемости плазмы: цыпленок, гусь, свинья, человек (консервированная плазма), теленок, корова, кролик, гвиней-

ская свинья, овца, лошадь, коза, человек (свежая плазма). На состав сыворотки и, следовательно, на ее фильтруемость оказывают влияние возраст, состояние здоровья и корм животного. У только что принявших пищу животных сыворотка содержит много липидов, что затрудняет фильтрацию. Поэтому сыворотку у животных следует брать через 12—24 ч после кормления. У молодых животных липидный показатель сыворотки также высокий; поэтому прежде чем брать у них кровь, их следует выдержать на глюкозно-водной диете. У анемичных животных содержание белков в сыворотке является пониженным и как следствие у них более высокое содержание фибриногена. Следует избегать также пользоваться сывороткой от переохлажденных, перегретых или обезвоженных животных. Главное здесь — уделить пристальное внимание источнику сыворотки. Правильно подобранную сыворотку легче фильтровать; возникающие при фильтрации трудности не следует относить обязательно на счет мембраны!

В большинстве случаев фильтрация сыворотки протекает успешнее на дисковых мембранах, чем на фильтр-патронах. Объемы фильтруемой сыворотки, как правило, невелики, а стоимость единицы площади фильтрующей поверхности фильтр-патронов в 3—6 раз выше, чем дисковых мембран. Применение дисковых мембран делает процесс фильтрации более гибким, поскольку в этом случае можно увеличить размеры фильтровальной установки настолько, насколько это требуется, что позволяет избежать избыточного увеличения площади поверхности, как это имеет место в случае применения фильтр-патронов. Кроме того, дисковые мембраны можно сгруппировывать как для предварительной, так и для окончательной фильтрации в одном и том же фильтродержателе, точно подобрав тип мембран и размеры их пор. Прекрасное рассмотрение практических аспектов фильтрации сывороток крови дается в книге, опубликованной фирмой «Майкрофилтрейшн системс» под названием «Фильтрация сыворотки и плазмы».

7.6. ПОЛУЧЕНИЕ СТЕРИЛЬНОЙ ВОДЫ

Мембранные фильтры нашли широкое применение для получения стерильной, свободной от каких-либо микроорганизмов воды. Из водопроводной воды можно получить дистиллированную или деионизованную воду, а затем еще более чистую и высококачественную, применяя обратный осмос (см. гл. 13). Хотя для производства стерильной воды можно использовать автоклавирование, в установках, производящих высококачественную воду методами деионизации или обратного осмоса, для стерили-

лизации воды общепринято использовать фильтрацию. Это позволяет получать из водопроводной воды стерильную воду с низкой ионной силой. Даже если при этом не обеспечивается полная стерильность, количество микроорганизмов в воде можно свести к очень низкому уровню, а это значительно упрощает проведение следующей стадии стерилизующей фильтрации.

Ниже приводятся некоторые рекомендации для правильного обслуживания установок по получению стерильной воды.

1. Повседневно и как можно чаще проводить стерилизацию распределительной системы (всех трубок и фильтров). Работу начинать всегда с предварительно очищенной водой. Ионообменную смолу в деионизаторе стерилизовать раз в 3—4 месяца 1 %-ным раствором формальдегида. Кроме того, каждые 3—4 месяца необходимо стерилизовать емкость для хранения стерильной воды хлорамином. Необходимо следить за тем, чтобы стерилизующие растворы проникали на всю длину трубок.

2. Использовать трубки и фитинги санитарного типа, изготовленные из нержавеющей стали (см. разд. 6.5). Необходимо избегать появления внутри системы нитей, вокруг которых могут скапливаться частицы и бактерии. Демонтировать неиспользуемые линии или несвязанные участки трубопроводной системы. Устройства для измерения давления должны быть диафрагменного типа и сделаны из нержавеющей стали, поскольку они отделяют измерительную систему (в которой могут развиться застойные зоны) от воды.

3. Непрерывный поток воды через систему предупреждает накопление бактерий в трубках. Если вода не выводится из системы, следует образовать рециркуляционный контур с выхода емкости для воды на ее вход вместе с водой, проходящей через стерилизующую мембрану. Рециркуляцию нужно организовать в нерабочие периоды и в тех случаях, когда поток воды снижается более чем вдвое против нормального.

4. Изолировать внутренний объем системы от возможного попадания примесей извне путем размещения мембранных фильтров у каждого выходного патрубка. Любая точка, в которой вода может выйти наружу, является местом попадания в нее бактерий и загрязнения системы. Мембранные фильтры необходимо ставить во всех местах, где имеются сообщения внутреннего объема системы с наружной средой, чтобы обезопасить систему в случае возможных утечек. Поэтому следует избегать контакта внутреннего пространства системы с наружной средой.

5. Проверять уплотнения и фильтр-патроны, прежде чем они будут установлены в систему. Имеется в виду, что фильтр-патроны необходимо испытывать в их корпусах непосредственно перед окончательной сборкой. Это даст уверенность в том, что

патрон установлен должным образом, а уплотнения и мембраны целы.

Если следовать приведенным только что рекомендациям, то система будет работать в течение длительного времени без каких-либо осложнений. Если количество бактерий, вводимых в систему, поддерживать на невысоком уровне благодаря предварительной стерилизации или обработке, то при расходе фильтруемой жидкости 19—26 л/мин мембраны могут сохраняться в работоспособном состоянии до года и более. За подробностями относительно того, как правильно установить систему стерилизации воды, следует обращаться к фирме-изготовителю. Многие фирмы, перечисленные в гл. 5 и изготавливающие мембранные фильтры, наряду с оказанием помощи и консультацией поставляют все необходимое оборудование и устройства для крупных установок по стерилизации воды.

7.7. МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Стерилизация продуктов фармацевтической промышленности является одной из наиболее важных областей применения мембранной фильтрации. Лекарства для инъекций (их принято называть в фармацевтической промышленности **парентеральными растворами**) *должны быть* стерильными. В США за этим следит *Ассоциация парентеральных лекарственных препаратов*. Кроме того, существует Ассоциация медицинских промышленников, которая разрабатывает требования к стерилизующим мембранам. Управление США по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств публикует специальные протоколы по фильтрации фармацевтических средств. Ознакомиться с основами этой фильтрации можно в работах Файфилда [74] и Двайера [66].

Глубинные или мембранные фильтры? Хотя для стерилизующей фильтрации фармацевтических препаратов можно применять как глубинные, так и мембранные фильтры, в качестве окончательных фильтров в настоящее время используют почти исключительно последние. Глубинные фильтры в большинстве случаев используют как предварительные для извлечения крупных частиц и продления срока службы мембранных фильтров. Мембранные фильтры в процессах фильтрации лекарственных препаратов обладают рядом следующих преимуществ перед глубинными:

1. Размеры пор мембранных фильтров можно определить с достаточной степенью точности, и, следовательно, возможна

абсолютная маркировка мембраны. При этом задержка бактерий мембранным фильтром с данным размером пор практически не зависит от скорости потока фильтруемой жидкости и перепада давления.

2. Для мембран, изготовленных из гомогенной пленки, исключена возможность отслаивания материала мембраны и попадания его в фильтрат, как это может быть в случае применения глубинного фильтра. Для приготовления инъекционных растворов крайне важно, чтобы они были не только стерильными, но и свободными от каких бы то ни было частиц, которые могли бы блокировать жизненно важные пути в живом организме.

3. В мембранном фильтре практически не удерживается фильтруемая жидкость, так что по завершении процесса фильтрации вся она оказывается в фильтрате.

4. Мембранный фильтр можно подвергнуть проверке на целостность методом точки пузырька как до начала проведения процесса фильтрации, так и после его завершения.

Однако следует указать и на ряд недостатков мембранных фильтров:

1. По сравнению с глубинными фильтрами они имеют немного бóльшую склонность к забиванию, особенно если размеры пор мембраны близки к размерам частиц фильтруемой жидкости.

2. При стерилизации мембранные фильтры более чувствительны к тепловому воздействию, чем глубинные, поэтому их подготовка к использованию должна сопровождаться гораздо бóльшими предосторожностями.

3. По сравнению с глубинными фильтрами у них ниже пропускная способность, так что их приходится заменять более часто.

4. Относительно более узкая избирательность мембранных фильтров означает, что в фильтрат может попасть достаточно много частиц, размеры которых чуть меньше размера пор. В глубинных же фильтрах большинство таких частиц окажутся задержанными.

5. Мембранные фильтры могут выделять в фильтрат токсичные вещества (например, смачивающий агент). Поэтому мембраны *должны иметь* соответствующий сертификат фирмы-изготовителя о пригодности их для стерилизующей фильтрации фармацевтических препаратов.

Предотвращение забивания. Идеальная схема стерилизующей фильтрации включает в себя предварительную фильтрацию через глубинный фильтр для извлечения крупных частиц и собственно стерилизацию с применением мембранного фильтра. Забивание мембраны можно выразить количественно отношением

объема фильтруемого материала к перепаду давления на мембране. Как видно из рис. 7.5, в отсутствие предварительного фильтра мембрана забивается быстро, результатом чего является снижение пропускной способности фильтрующей системы. Применение глубинного фильтра в качестве предварительного позволяет намного увеличить пропускную способность.

Очень важно, чтобы предварительный и мембранный фильтры были правильно согласованы друг с другом. Если глубинный фильтр окажется слишком грубым, то большие частицы будут задерживаться им недостаточно эффективно, и мембрана будет быстро забиваться. Однако если глубинный фильтр будет слишком тонким, то он сам быстро выйдет из строя. Поэтому необходима такая комбинация глубинного и мембранного фильтров, чтобы они забивались примерно за одно и то же время, иными словами, чтобы каждый из них выполнял ту функцию, для которой он предназначен.

Механизм стерилизующей фильтрации. Хотя, как правило, мы считаем, что окончательный мембранный фильтр является абсолютным, т. е. способным извлекать все частицы, размеры которых превышают размер его пор, в действительности в нем всегда есть некоторая доля пор, имеющих большие размеры по сравнению с теми, которые указываются в технической документации, и пропускающих сквозь себя бактерии [118]. Как убедительно показал Воллхаусер [232], любой стандартный материал, из которого изготавливаются мембранные фильтры, может пропускать несколько микроорганизмов при определенных условиях и в некоторых пределах. Эти микроорганизмы можно обнаружить, если через мембрану пропустить достаточно большой объем жидкости и *весь* фильтрат подвергнуть анализу на присутствие в нем жизнеспособных микроорганизмов. Если в исходной смеси, подлежащей фильтрации, содержится небольшое количество микроорганизмов, то те редкие из них, которые попадут в фильтрат, не оказывают значительного влияния на качество стерилизации. Воллхаусер подчеркивает, что отделение бактерий фильтрацией является не методом стерилизации, а представляет собой асептическую процедуру. Таким образом, крайне важно, чтобы в фильтруемой жидкости было как можно меньше бактерий. Поэтому множество проблем может быть снято, если исходный материал перед стерилизующей фильтрацией будет осветлен.

Значительное внимание следует уделить и тому, чтобы избежать загрязнений, которые могут попасть в фильтруемую среду из помещения, в котором проводится фильтрация, поскольку в конечном счете такие предосторожности обходятся дешевле, чем последующее извлечение примесей с помощью фильтрации. Согласно рекомендациям, в любом исходном лекарственном

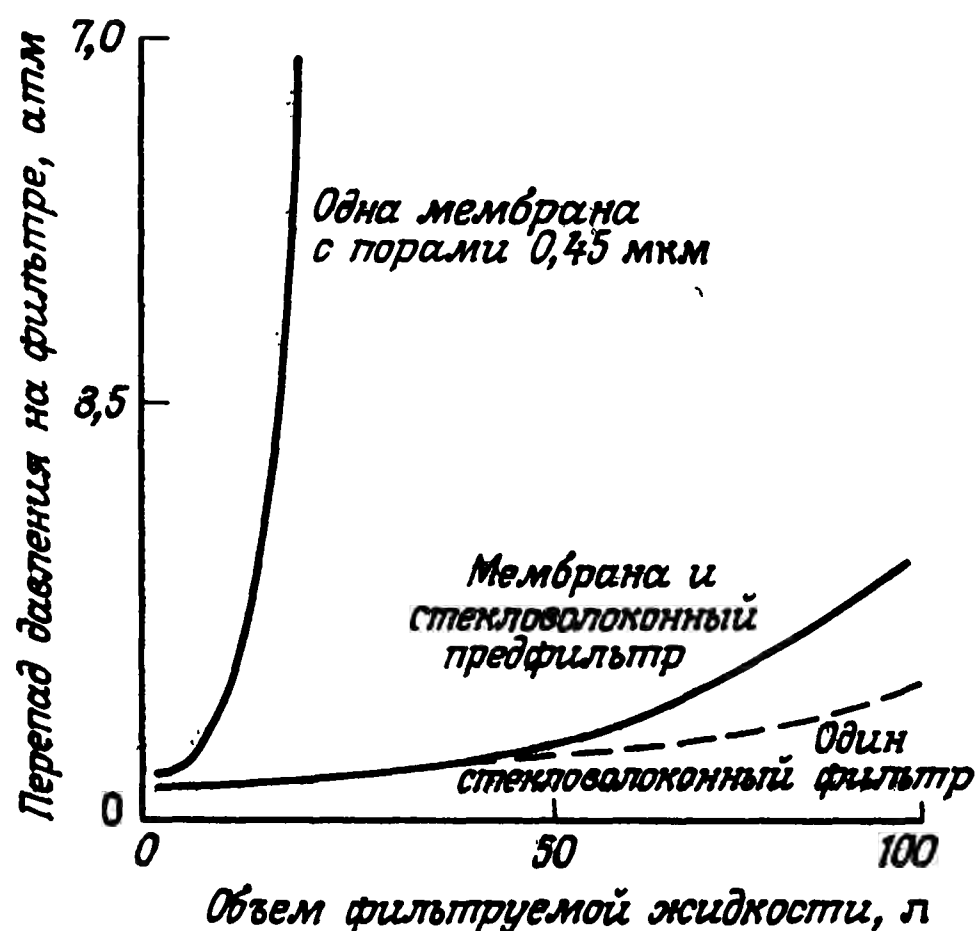


Рис. 7.5. Влияние предфильтра на скорость забивания мембран при крупномасштабной фильтрации. Постоянство расхода жидкости поддерживается подъемом давления по мере забивания мембраны. На забивание указывает рост перепада давления на мембране.

препарате, подлежащем стерилизующей фильтрации, должно содержаться не более 100 жизнеспособных бактерий на 1 мл жидкости. Следует также обращать внимание на то, чтобы в задержанном мембраной материале оставалось как можно меньше исходной жидкости.

Вопросы, связанные с подбором мембраны. В литературе по лекарственным препаратам велась интенсивная дискуссия по поводу того, как следует испытывать (т. е. квалифицировать) мембрану, которую предполагается использовать для стерилизующей фильтрации. Проверку целостности мембран осуществляют методом точки пузырька, но каким образом потребитель может установить, что именно этот тип мембраны лучше всего подходит для фильтрации данного лекарственного препарата?

Стандартным решением является метод задержки бактерий [159, 133], при котором через фильтр-патрон или дисковую мембрану пропускают жидкость с известным количеством бактерий, а затем в фильтрате определяют их наличие. Существуют противоречивые мнения по поводу того, сколько бактерий должно содержаться в исходной жидкости. Рэти [176] доказывает, что доза бактерий должна быть такой, чтобы на квадратный микрометр поверхности мембраны приходилось по два жизнеспособных микроорганизма или $2 \cdot 10^8$ клеток на квадратный сантиметр. Идея заключается в том, чтобы на каждую пору приходилось по бактерии. После фильтрации весь объем фильтрата анализируется на содержание в нем жизнеспособных бактерий. Фильтрация считается успешной, если роста бактерий в фильтрате не обнаруживается. Джонстон и Мельцер [118], напротив, доказывают, что этот метод не достигает поставленной цели.

Эти авторы выполнили статистические расчеты, из которых следует, что не на всех порах будут бактерии, даже если будет приходится по две бактерии на квадратный микрометр; они показали, что в среднем 15 % пор будут свободными, причем к этим свободным порам относятся не поры со средними размерами, которые представляют действительный интерес, а самые крупные. Микроорганизмы фильтруемой жидкости будут проходить предпочтительно через эти крупные поры, т. е. там, где пропускается большая часть жидкости. Наконец, Джонстон и Мельцер указывают на то, что ошибки при оценке параметров мембран, используемых в крупномасштабных мембранных установках, могут быть на порядок выше или ниже действительно необходимого значения. Авторы приходят к выводу о том, что для стерилизующей мембраны вполне удовлетворительным является значение ЛПС (см. разд. 7.1), равное 8; оно легко достигается при незначительном числе бактерий в исходной фильтруемой жидкости. Поскольку на практике почти всегда применяются серии предфильтров, нагрузки по числу бактерий на стерилизующие мембраны оказываются небольшими. Как мы отмечали выше, подлежащая фильтрации жидкость должна содержать не более 100 микроорганизмов на миллилитр; подобные требования предписываются также и другими национальными фармакопеями.

Важное значение имеет проверка мембранной установки на целостность методом точки пузырька до и после проведения процесса фильтрации. Можно также использовать в этих целях метод диффузии (см. разд. 4.2). Некоторые подробности, касающиеся установки систем мембранных фильтров, мы рассмотрели в разд. 6.6. Там же было указано, как определить параметры фильтрующей системы для тех или иных нужд. Проверка целостности мембран методом фильтрации жидкостей, содержащих бактерии, рассматривалась в разд. 4.6. Проблемы фильтрации различного рода жидкостей, используемых в фармацевтической промышленности, рассматриваются в работе [74].

Важным обстоятельством, которое следует учитывать при выборе фильтров и мембран для изготовления лекарственных препаратов, является наличие в пористых перегородках экстрагируемых веществ, которые могут перейти в фильтрат. Этот вопрос подробно обсуждался в разд. 4.7. Фильтры и мембраны различных фирм существенно отличаются друг от друга по содержанию в них экстрагируемых веществ вследствие различий либо в химическом составе исходных компонентов, используемых для получения пористых материалов мембраны, либо в самом технологическом процессе их приготовления. Хотя производители мембран и фильтров могут установить, что то или иное их изделие содержит, например, малое количество экстрагируемых веществ, конкретных данных они, как правило, не приводят, не

говоря уже о том, что возможны большие колебания этого показателя для одного и того же типа пористого материала от одной партии к другой. Однако для стерилизующей фильтрации *можно* заказать производителю мембрану с низким содержанием экстрагируемых веществ. Заметим, что федеральное законодательство США не требует, чтобы использовался какой-либо конкретный пористый материал, который содержал бы определенное количество экстрагируемых веществ. Имеются лишь требования, чтобы конечный продукт был непирогенным. Для удаления из мембранного фильтра любых экстрагируемых веществ Олсон [159] рекомендует, прежде чем использовать мембрану, промыть ее в собранном виде либо 100 литрами воды для инъекций на квадратный метр поверхности мембраны, либо 10 литрами 0,1 М соляной кислоты, а затем 40 литрами воды для инъекций. (Водой для инъекций называется не содержащая пирогенных веществ вода, пропущенная через мембрану с порами 0,2 мкм.) Чтобы определить пригодность мембраны или фильтра для того или иного конкретного применения при приготовлении лекарственных препаратов, потребитель должен произвести проверку на содержание токсичных и экстрагируемых веществ (см. разд. 4.7 и 4.8) в том образце пористого материала, который был предварительно промыт, как это описано выше, а затем некоторое время выдержать его в условиях, близких к тем, при которых он будет работать (подробнее об этом см. в работе [159]).

Выбор типа мембраны. Тип фильтрующей системы для стерилизации лекарственных растворов будет определяться природой этих растворов, объемом фильтруемого материала и его фасовкой (разливка в бутылки, флаконы или ампулы, упаковка и т. д.). Метод расчета необходимой площади поверхности мембран мы рассматривали в гл. 6.

При количествах фильтруемой жидкости от малых до средних можно использовать дисковые мембраны. Для фильтрации больших объемов предпочтение следует отдать мембранам в патронном исполнении. В обоих случаях существенно, чтобы мембранная установка исключала загрязнение конечного продукта. Длина выходного патрубка системы должна быть по возможности короче, чтобы стерильный продукт быстрее попадал в приемник. Поскольку источниками загрязнений в системе нередко являются краны, которые располагаются, как правило, на тех участках, где во время работы возможен рост бактерий, крайне важно, чтобы все краны находились на входной стороне мембранного фильтра.

Для стерилизации не рекомендуется вакуумная фильтрация. Здесь предпочтительней фильтрация под давлением. Это позволяет получить более высокую производительность, предотвра-

тить подтеки *внутрь* системы, направить конечный стерильный раствор непосредственно в приемную посуду, без вскрытия системы провести проверку по методу точки пузырька, уменьшить возможность вспенивания растворов белков и как следствие денатурацию белков и предотвратить испарение растворителей. Давление может быть создано либо сжатым газом (который сам должен быть предварительно отфильтрован), либо гидравлическим насосом. Величина давления должна быть такой, чтобы обеспечить необходимую скорость потока жидкости. Желательно, чтобы начальное давление было невысоким, иначе мембрана может разрушиться или преждевременно забиться частицами, попавшими в ее матрицу. В последнем случае, даже если при высоком давлении начальная скорость потока будет большой, среднее ее значение за весь период фильтрации может оказаться меньше. Если предполагается, что процесс фильтрации будет сопровождаться забиванием, для увеличения пропускной способности системы следует использовать серию последовательно расположенных мембран. При этом размер пор каждой последующей мембраны должен быть меньше, чем у предыдущей.

Преимущества фильтр-патронов при стерилизации лекарственных препаратов. Хотя можно использовать мембраны как в виде патронов, так и в виде дисков, первые при прочих равных условиях, по-видимому, являются более предпочтительными. Они обладают следующими преимуществами:

1. Их можно легко и быстро устанавливать и заменять. Обращение с дисковыми мембранами, имеющими большую площадь поверхности, — довольно сложное дело, тогда как фильтр-патроны в этом отношении значительно более просты.

2. Мембранный фильтр в патронном варианте защищен, и его трудно разрушить, в то время как дисковая мембрана может быть легко повреждена в результате какой-то случайности.

3. У фильтр-патронов два кольцевых уплотнения, каждое из которых имеет небольшой периметр и как следствие низкую вероятность утечек. Напротив, крупные дисковые мембраны имеют большую поверхность уплотнения и, следовательно, значительную вероятность утечек.

4. Хотя первоначальные затраты на изготовление корпусов для мембран в виде фильтр-патронов могут оказаться больше, чем для дисковых мембран, текущие затраты по замене уплотнений, несущих подложек и т. д. больше в последнем случае.

5. Корпус фильтр-патрона легче поддается очистке, чем корпус дисковых мембран.

6. Площадь, занимаемая корпусом фильтр-патрона, значительно меньше, что может оказаться важным фактором в стес-

ненных производственных условиях со сложной системой фильтрации.

7. Управление США по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств предъявляют жесткие требования ко всем процессам фильтрации, касающимся производства медикаментов. Поскольку отдельные дисковые мембранные фильтры не имеют соответствующих пометок, всегда есть какая-то вероятность извлечь из упаковки и использовать не ту мембрану, которая нужна. Фильтр-патроны имеют идентифицирующую маркировку, что исключает возможные ошибки.

Стерилизацию фильтровальной установки предпочтительно проводить непосредственно там, где ее используют, применяя продувку паром. При этом не столь важно, будут ли предфильтры стерильными. Действительно, поскольку в результате стерилизации водяным паром возможно повреждение предфильтров, лучше их сохранить нестерильными, но целыми. Если для стерилизации нельзя использовать водяной пар, можно использовать окись этилена, но, прежде чем начать проводить фильтрацию, из фильтров и мембран необходимо удалить все посторонние химические вещества.

Специальные вопросы. В некоторых случаях при производстве лекарственных препаратов может оказаться необходимым извлекать с помощью фильтрации частицы с размерами, меньшими чем у бактерий. Например, при определенных условиях требуется извлекать вирусы, эндотоксины, ферменты или другие компоненты смеси. В этих случаях следует использовать последовательную фильтрацию с дополнительной ступенью, устанавливаемой после мембраны для извлечения бактерий и в которой мембрана должна иметь еще меньшие размеры пор (возможно, даже ультрафильтр). Поскольку фильтр-патронов с размерами пор, меньшими чем 0,2 мкм, не существует, можно использовать дисковые мембраны в составе различных ультрафильтрационных устройств (см. гл. 13).

Для извлечения вирусов и эндотоксинов можно использовать также мембраны или фильтры, несущие при значениях pH, близких к нейтральным, положительный заряд. Как указывается в разд. 12.5, на этих мембранах могут задерживаться частицы очень малых размеров. Хоу и др. [112] рассмотрели возможность применения таких пористых перегородок с положительным зарядом для извлечения эндотоксинов из растворов, предназначенных для парентерального введения. Характерное преимущество пористых материалов, поверхность пор которых несет положительный заряд, заключается в том, что благодаря большим размерам пор забивание их не представляет серьезной проблемы. Поэтому срок их службы дольше, чем у обычных мем-

бран, несущих в области нейтральных рН отрицательный заряд, с теми же задерживающими свойствами.

Мембранные установки. На рис. 7.6 приведена схема фильтровальной установки для стерилизации лекарственных препаратов. Следует обратить внимание на то, что мембранные фильтры располагаются во многих местах. Обсуждению некоторых принципов стерилизующей фильтрации, применяемой в фармацевтической промышленности, посвящена работа [74].

Для поддержания общей чистоты важное значение имеет то, насколько тщательно сконструирована фильтровальная установка. Внутренний объем системы должен быть надежно изолирован от внешней среды с помощью мембранных фильтров, размещенных в каждом выходном патрубке и во всех тех местах, где в систему может попасть воздух. Должны быть исключены все застойные зоны, к которым относятся любые участки труб, превышающие в три или более раз длину основной системы. Все места уплотнений следует часто проверять на подтеки; при обнаружении их следует немедленно устранять. Все распределительные линии должны иметь уклон, а жидкость следует постоянно рециркулировать (по возможности), поскольку застой жидкости способствует росту бактерий. Любые реагенты или детали оборудования, вновь попадающие в систему, должны быть предварительно очищены. Необходимо как можно чаще проводить санитарную обработку всей системы. Имеется в виду введение в нее бактерицидных агентов (хлора или иного, совместимого с данной системой вещества) и их прохождение через всю распределительную часть системы. Рекомендуются дважды в неделю проводить санитарную обработку застойных зон и один раз в неделю — основного рециркуляционного контура системы. Все части системы должны контактировать с бактерицидным агентом не менее 20 мин. Наконец, остатки агента следует вымыть большими количествами чистой (свободной от каких-либо частиц) воды пропустив ее через всю систему.

Для продления срока службы мембранного фильтра и в целях экономии финансовых затрат его *нельзя* подвергать обратной промывке. Мембрана может оказаться поврежденной, и, кроме того, могут высвободиться накопившиеся на ее поверхности бактерии, являющиеся источником пирогенных агентов. В случае забивания мембраны ее необходимо заменить новой. Если забивания мембран не происходит, их тем не менее нужно менять через каждые 8 ч работы во избежание образования пирогенных агентов — компонентов тех бактерий, которые оказались задержанными на мембране. Полезные сведения по санитарии фильтрационных установок в фармацевтической промышленности приведены в работе [142].

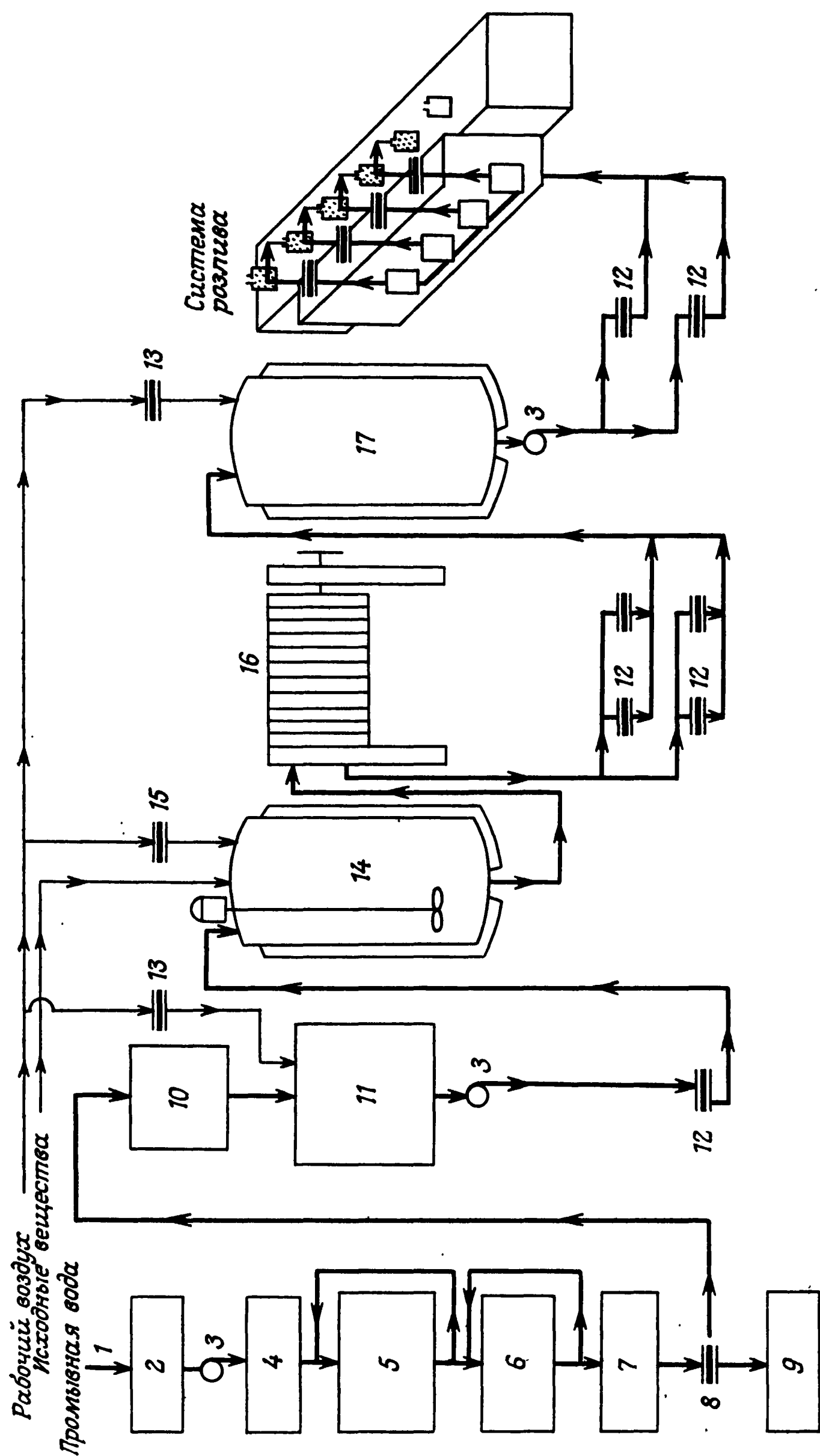


Рис. 7.6. Схема установки для стерилизации лекарственных препаратов в соответствии с Нормами прогрессивной технологии Управления США по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств. (Займствовано из материалов, предоставленных фирмой «Шляйхер и Шуль».) 1 — подача воды; 2 — предфильтр; 3 — насос; 4 — обратный осмос; 5 — ионный обмен в смешанном слое; 6 — фильтр-патрон с ионообменной смолой; 7 — глубинный фильтр; 8 — дисковая мембрана с порами 5 мкм; 9 — моечная машина для ампул; 10 — перегнанный конденсат; 11 — стерильная продувочная система; 12 — дисковая мембрана с порами 0,2 мкм; 13 — тефлоновая мембрана с порами 0,5 мкм; 14 — емкость для смешения; 15 — тефлоновая мембрана с порами 1,0 мкм; 16 — глубинный фильтр (предфильтр); 17 — емкость для хранения.

Предписания Управления США по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA). Многие из операций при фильтрации лекарственных препаратов выполняются в соответствии с правилами, установленными FDA; аналогичные правила действуют в большинстве стран мира. FDA разработало «Современные нормы прогрессивной технологии» [англ. Current Good Manufacturing Practices (сокращенно CGMP или GMP)], обязательные при производстве парентеральных растворов, вводимых в организм массивно, т. е. в больших объемах [англ. large-volume parenterals (LVP)], и рекомендуемые при производстве этих растворов, вводимых в организм малыми дозами. LVP определяют как водный раствор лекарственного препарата, окончательно стерилизованный в количестве одной заправочной дозы во флакон объемом 100 мл и более. К категории LVP относятся препараты для внутривенных вливаний, орошающие растворы, брюшинные диализаты и консервированная кровь с антикоагулянтами. Установленные правила диктуют требования не только к стерильности окончательного продукта, но и к конструкции фильтрационной системы и к условиям ее работы. Например, чтобы трубы для воды можно было стерилизовать водяным паром, они должны быть сварными из нержавеющей стали и иметь в местах разъема фитинги санитарного типа. Во избежание застойных явлений в жидкости и для развития турбулентности и лучшего массообмена в неиспользуемом (тупиковом) участке трубы, где возможен рост бактерий, длина этого участка трубы не должна превышать шести ее диаметров. Для обеспечения полного стока и предупреждения обратного попадания в систему жидкости трубопроводы должны иметь уклон. В конечном продукте не должны содержаться волокна, особенно асбестовые. Поскольку глубинные фильтры почти всегда выделяют из себя волокна, их нельзя использовать в качестве конечных. Применяемая для промывки и приготовления продуктов вода (см. разд. 7.5) должна быть пропущена через невыделяющую волокон мембрану с диаметром пор не более 0,2 мкм (или 0,45 мкм, если фильтруемая вода содержала особенно мало бактерий). Прежде чем использовать любые мембраны, предназначенные для фильтрации аэрозолей или жидкостей, необходимо проверить их целостность, причем мембраны для фильтрации жидкости следует проверять на целостность и после их использования. Хотя специальные указания о конкретном методе проверки целостности мембран отсутствуют, в большинстве случаев это должен быть метод точки пузырька. Важно, чтобы устанавливаемые в фильтровальную систему мембраны были стерильными, причем стерилизацию рекомендуется осуществлять автоклавированием.

Важной особенностью предписаний является их требование к ограничению времени фильтрации определенными пределами с целью предотвратить избыточный рост микроорганизмов до окончательной фильтрации, который вызывает образование эндотоксинов. Восемь часов — предельно допустимое время между вводом воды в смесительную емкость и стерилизацией последней порции фильтруемой жидкости. Кроме того, любые используемые в системе фильтры и мембраны должны быть либо очищены, либо заменены после 8 ч их работы. Размеры пор конечного мембранного фильтра не должны быть больше 0,45 мкм, даже если продукт высоковязкий и с трудом фильтруется. Прежде чем готовый продукт пустить в продажу, он должен пройти лабораторный контроль на содержание пирогенных веществ, отдельных частиц и на стерильность. Для контроля на пирогенность следует брать пробы из первого и последнего флаконов, заполненных в данной партии, а также из любых флаконов, при заполнении которых имел место значительный перерыв. При проверке на стерильность необходимо исследовать контрольные флаконы в каждой партии. В общем случае испытания на стерильность проводят методом мембранной фильтрации, описание которого приводится в разд. 7.11. Число флаконов, которые должны подвергнуться испытаниям на стерильность, может меняться, однако для больших партий (состоящих из более 500 флаконов) их минимальное число должно составлять 20 (или не менее 2 %). Партия определяется как серия одинаково заполненных герметически закупоренных флаконов, приготовленных таким образом, что вероятность нарушения стерильности для них одинакова.

7.8. ФИРМЫ, ИЗГОТАВЛИВАЮЩИЕ КРУПНОМАСШТАБНЫЕ ФИЛЬТРАЦИОННЫЕ УСТАНОВКИ

Большое число фирм для фильтрации лекарственных препаратов предлагают фильтрационные установки на основе фильтропатронов. В некоторых из этих установок стерилизующая фильтрация осуществляется не мембранами, а глубинными фильтрами с очень тонкими каналами пор. Ниже перечислены некоторые из этих фирм (адреса этих фирм можно найти в гл. 5).

● «Абкор инкорпорейтед» изготавливает фильтр-патроны рулонного типа со спиралеобразно уложенными мембранами для санитарной ультрафильтрации. Перед использованием такие устройства можно продезинфицировать нагреванием; их также можно использовать совместно с установкой для мембранной

фильтрации. Мембраны сделаны из материала, состав которого фирма не сообщает.

● «Алсоп инжиниринг компани» поставляет главным образом глубинные фильтры в виде больших дисков из целлюлозы или асбоцеллюлозы для грубой фильтрации, но выпускает наряду с этим и асбоцеллюлозные стерилизующие фильтры. Согласно данным этой фирмы, дзета-потенциал (ζ -потенциал) асбестового волокна положителен и его величина выше, чем у любого другого фильтрующего материала; это способствует лучшему задерживанию коллоидных частиц. Установка Алсоп имеет цилиндрический фильтродержатель, в котором можно разместить сразу несколько фильтрующих дисков. Следует, однако, заметить, что в соответствии с действующими в настоящее время нормами CGMP использование фильтров из асбеста в качестве последней ступени стерилизующей фильтрации запрещено.

● «Болстон компани» предлагает трубчатые фильтр-патроны из стекловолокон, скрепленных смолой на основе фторуглерода; такие фильтры устойчивы к действию высоких температур и коррозионно-активных сред. Хотя это и глубинные фильтры, их задерживающие характеристики приближаются к абсолютным. Поэтому их можно использовать для бактериальной фильтрации в разных целях. Фильтры «Болстон» нашли широкое применение при крупномасштабной фильтрации микробов и вирусов, содержащихся в природной воде (см. гл. 12).

● «Боултон корпорейшн» производит бумажные фильтры большого диаметра для работы при высоких давлениях, а также трубчатые бумажные фильтры. Все это главным образом глубинные фильтры, которые можно использовать для осветления или на стадии, предшествующей стерилизующей фильтрации.

● Отдел промышленных фильтров «Карборундум компани» выпускает фильтрующие устройства рулонного типа для глубокой фильтрации. В качестве фильтрующих материалов здесь используются хлопчатобумажная ткань; искусственный шелк на основе целлюлозы, ацетат, полипропилен и стекловолокно. Полипропилен и стекловолокно можно применять для фильтрации суспензий с частицами диаметром 1 мкм. Фильтры фирмы «Карборундум», хотя они и не являются абсолютными, нашли широкое применение для фильтрации вирусов при анализе загрязненной воды (см. гл. 12).

● Группа по производству фильтров фирмы «Кокс инструмент компани» изготавливает дисковые фильтры и складчатые фильтр-патроны, предназначенные для субмикронной фильтрации. Фильтрующий элемент здесь представляет собой матрицу из стеклянных и целлюлозных волокон, скрепленных смолой. Главными достоинствами такого элемента являются его высокая производительность и то, что он может работать длитель-

ное время до забивания загрязняющими фильтруемую среду примесями.

- «Эртель инжиниринг компани» производит плоские фильтродержатели для промышленного применения. Для субмикронной фильтрации фирмой изготавливаются асбестовые диски, которые можно использовать в тех же установках. Модель EDB широко применяется в фармацевтической промышленности с целью извлечения пирогенных веществ и бактерий. Чтобы исключить частицы асбеста, которые могут попасть в фильтрат, конечный продукт после фильтра Эртель следует подвергнуть дополнительной очистке на волоконном фильтре.

- «Филтерит компани» изготавливает мембранные и фильтрующие устройства рулонного типа для фильтрации больших объемов жидкости. В качестве фильтрующего материала используется большое количество различных веществ, в том числе хлопчатобумажная ткань, искусственный шелк на основе целлюлозы, акрил, полипропилен, стекловолокно, нейлоновое волокно и тефлон. Для субмикронной фильтрации применяют последние два материала. Фильтры фирмы «Филтерит» широко применялись для фильтрации вирусов (см. гл. 12).

- «Гелман сайенсиз» предлагает высокопроизводительную установку из последовательно размещенных фильтр-патронов со складчатыми мембранами. Наряду с этим предлагаются глубинные фильтры для предварительной фильтрации. Мембраны делают из акрила, тефлона или полисульфона. Фирма поставляет также фильтр-патроны разового пользования, («капсулы») для стерилизующей фильтрации небольших объемов жидкостей, сделанные из Таффрина НТ (термостойкий ароматический сополимер) и из акрила.

- «Мембрана инкорпорейтед» (отделение «Гайа») производит фильтр-патроны с нейлоновыми мембранами, имеющими размер пор 0,2 и 0,4 мкм. Мембранный материал наносится на полипропиленовую основу, играющую роль предфильтра, и эта сборка в виде гофрированного листа укладывается в патроне вокруг внутреннего сердечника из полипропилена (см. рис. 6.2).

- «Миллипор компани» изготавливает разнообразные фильтр-патроны для фильтрации больших объемов жидкостей. В их фильтр-патронах Миллитьюб мембрана сделана из эфиров целлюлозы и совмещена с предфильтром из стекловолокна складчатой формы. Фильтр-патрон Флюоротьюб имеет сходную конструкцию, но мембрана у него сделана из тефлона, а у трубчатого модуля Стерифло между верхним бумажным слоем и нижним слоем, представляющим собой сетчатую структуру из полиэтилена, размещена микрофильтрационная мембрана из производных целлюлозы. Фирма «Миллипор» изготавливает также фильтр-патроны для очистки воды.

- Фирма «Нуклепор» поставляет быстропромываемые фильтр-патроны (QR), предназначенные для субмикронной фильтрации. В них используются мембраны капиллярного типа из поликарбоната или полиэфира, зажатые между полипропиленовыми сетками. Для фильтрации больших объемов жидкости эта фирма выпускает также установки с мембранами в виде дисков.
- Фирма «Пол корпорейшн» продает установки для высокопроизводительной фильтрации, снабженные патронами со складчатыми мембранами из нейлона. В связи с тем что нейлон является гидрофильным, нет необходимости в смачивающих мембрану агентах. Эта фирма располагает мембранами с размерами пор меньше 0,1 мкм для стерилизующей фильтрации.
- Фирма «Сарториус» выпускает установки (Sartobran line) из последовательно соединенных патронов со складчатыми мембранами; они предназначены для задерживания частиц размерами 0,2 и 0,45 мкм. Мембраны изготавливаются из ацетилцеллюлозы. В фильтр-патроне имеются предфильтры из целлюлозы или полипропилена. Производимые этой фирмой фильтр-патроны содержат мембраны и предназначены для стерилизации воздуха.
- Фирма «Серфилко компани» не продает мембранные фильтры, но поставляет разнообразные глубинные фильтры для предварительной фильтрации.
- Фирма «Зейтц филтерс» производит асбоцеллюлозный фильтрующий материал для стерилизующей фильтрации. Его используют в установках либо с горизонтальным, либо с вертикальным расположением фильтров, однако после этих фильтров требуется доочистка фильтрата для удаления асбестовых волокон.
- Фирма «Стар системс» изготавливает в широком ассортименте глубинные фильтры для крупномасштабных установок. Хотя эта фирма выпускает главным образом осветляющие фильтры, она располагает также и фильтрами для целей стерилизации. Материал фильтров — нетканая хлопчатая бумага или чистая целлюлоза со связующим.

В разд. 6.5 мы рассмотрели вопрос о корпусах фильтр-патронов. Большинство фирм, производящих последние, поставляют также различные переходники к ним, так что их фильтр-патроны можно использовать с корпусами, изготавливаемыми другими фирмами.

7.9. ШПРИЦ-НАСАДКИ ДЛЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ НЕБОЛЬШИХ ОБЪЕМОВ ЖИДКОСТЕЙ

Большинство фирм поставляют фильтродержатели, которые используются совместно со шприцами и иглами для подкожных инъекций. Эти устройства, называемые шприц-насадками,

представляют собой прекрасные инструменты для стерилизации небольших объемов жидкостей и широко применяются для фильтрации радиоактивных изотопов, медикаментов, коферментов, ферментов и других дорогих и высокоактивных продуктов. Типичным примером таких устройств являются шприц-насадки, предлагаемые фирмой «Миллипор». Имеются шприц-насадки диаметром 13 мм из нержавеющей стали типа Суинни (см. рис. 6.11), а также шприц-насадки диаметрами 13, 25 и 47 мм из пластмассы типа Суиннекс (рис. 7.7, а). Фильтродержатели имеют на входе охватывающую часть люеровского соединения, в которую вставляется шприц, а на выходе — входящую его часть для присоединения иглы. В отдельных случаях можно применять предварительно простерилизованные шприц-насадки разового использования (типа Миллекс) с мембранами, имеющими поры 0,22 или 0,45 мкм (рис. 7.7, б). Эти устройства весьма удобны, если они употребляются совместно с предварительно простерилизованными иглами и пластмассовыми шприцами разового использования. С их помощью вручную можно быстро



Рис. 7.7. Шприц-насадки для стерилизующей фильтрации. а — шприц-насадка многократного использования типа Суиннекс; б — сменная стерилизованная шприц-насадка разового использования типа Миллекс. (С разрешения фирмы «Миллипор корпорейшн».)

стерилизовать растворы небольших объемов, используя одновременно несколько шприц-насадок. В шприц-насадках Миллекс мембраны имеют подложки с обеих сторон, поэтому с их помощью фильтрацию можно проводить в обоих направлениях. Так, применяя эти насадки, можно либо засасывать лекарство в шприц из флакона, либо, наоборот, вводить его шприцем во флакон или какой-либо другой сосуд. Для непрерывного розлива растворов можно использовать автоматический дозатор, разместив его между шприцем и фильтродержателем. Шприц-насадки разового или повторного использования изготавливаются также фирмами «Гелман», «Сарториус», «Шляйхер и Шуль» и «Майкрофилтрейшн системс».

При использовании шприц-насадки желательно, чтобы шприц имел объем более 10 мл, поскольку при меньших объемах под плунжером (из-за малой площади его поперечного сечения) может возникнуть избыточное давление, способное разрушить мембрану. При проведении асептической инъекции вначале заполняют шприц лекарственным раствором, затем из стерильной упаковки аккуратно извлекают шприц-насадку и присоединяют ее к шприцу. После этого шприц располагают вертикально так, чтобы мембрана оказывалась наверху, и медленно подают плунжер вверх, до тех пор пока из шприца не выйдет весь воздух. Это свидетельствует еще и о том, что мембрана должным образом увлажнилась и исключено образование воздушных пробок. Возможна также обратная процедура, а именно засасывание нестерильного раствора в стерильный шприц через стерильную шприц-насадку. По заполнении шприца снимают фильтродержатель и в шприц вставляют новую стерильную иглу, после чего можно осуществлять инъекцию уже стерильного раствора.

Шприц-насадку перед использованием и после него следует испытать на целостность мембранного фильтра. Для первой проверки, после того как мембрана полностью увлажнится, плунжер шприца нужно медленно отвести назад. Целая полностью увлажненная мембрана будет упруго сопротивляться движению плунжера, тогда как поврежденная окажет слабое сопротивление, либо вовсе не будет препятствовать его движению. После же использования шприц-насадки надо попытаться обратным движением плунжера засосать воздух в шприц. Если мембрана не была повреждена, то воздух не может попасть обратно в шприц. Шприц-насадки не рекомендуется испытывать по методу точки пузырька, поскольку во время проведения такого испытания может нарушиться герметизация.

Большинство мембран, используемых в шприц-насадках, пропитано увлажняющими агентами, которые при необходимости можно удалить промывкой 20—25 мл воды. Заметим, что при фильтрации неводных жидкостей следует принимать во внима-

ние химическую совместимость материалов мембраны и шприц-насадки. При наличии на этот счет каких-либо сомнений следует обратиться к технической документации изготовителя (см. также разд. 4.5).

Объем жидкости, которую можно пропустить через шприц-насадку, будет зависеть от количества частиц в этой жидкости. Через шприц-насадку с мембраной диаметром 47 мм обычно фильтруют 500—600 мл чистой воды, 300—400 мл водопроводной или 4—8 мл сыворотки. Если через одну и ту же шприц-насадку нужно пропустить жидкость из нескольких шприцев, то необходимо следить за тем, чтобы при их замене не образовывалось воздушных пробок. Для этого шприц-насадку при замене шприца оставляют заполненной жидкостью и перед соединением с новым шприцем из последнего удаляют воздух. Чтобы уменьшить опасность забивания мембраны, давление, создаваемое шприцевыми плунжерами, должно быть небольшим. При фильтрации дорогостоящих жидкостей всегда желательно, чтобы в фильтродержателе задерживался как можно меньший ее объем; шприц-насадку нужно для этого наклонить вниз и ввести плунжером в шприц вместе с жидкостью несколько миллилитров воздуха. Повторяя эту процедуру, можно добиться того, чтобы в шприц-насадке оставалось не более 0,1—0,2 мкл дорогостоящей жидкости.

Ниже дается список традиционных названий шприц-насадок, предлагаемых некоторыми фирмами.

Фирма	Шприц-насадка
«Гелман»	Акродиск
«Сарториус»	Минисарт
«Миллипор»	Суиннекс
»	Миллекс
«Нуклепор»	Поп-Топ
»	Суин-Лок
«Майкрофилтрейшн системс»	Систем-1
«Шляйхер и Шуль»	030

Для шприцевой фильтрации относительно больших объемов жидкостей фирма «Миллипор» производит сменные шприц-насадки Стеривекс-GS в патронном исполнении, в состав которых входит мембрана с порами 0,22 мкм и небольшим количеством экстрагируемых веществ, а также гидрофобная мембрана для фильтрации воздуха с порами 0,20 мкм. Площадь фильтрационной поверхности мембраны составляет 10 см²; на входе устройство имеет охватывающую часть соединения Люера, а на выходе — входящую его часть, к которой можно подсоединить либо шланг, либо иглу.

Шприц-насадки нашли широкое применение в фармацевтиче-

ской практике. Хотя многие медикаменты поставляются в клиники или лаборатории стерильными, часто оказывается необходимым добавить к ним еще какие-нибудь вещества, прежде чем ввести лекарство пациенту. Особенно в клинической практике принято *подмешивание* в стерильных условиях солевых растворов, гормонов, антибиотиков и других веществ к уже стерильным растворам для внутривенных вливаний (парентеральные растворы, вводимые массируемо). Помимо риска, связанного с попаданием микробов во время подмешивания, имеется также возможность того, что в лекарство попадут посторонние инертные частицы, которые могут оказать вредное действие на организм пациента при внутривенном вливании; к ним относятся мельчайшие частицы металла от игл, кусочки резины, осколки стекла от ампул, нерастворенные частицы лекарства, волокна из окружающего воздуха, перхоть, волосы, частички грязи и т. д. Благодаря применению мембранной фильтрации все это остается на мембране. Что касается микробов, следует подчеркнуть, что они могут в больших количествах находиться в визуально абсолютно прозрачном растворе. Чтобы стала видимой мутность жидкости, она должна иметь концентрацию бактерий по крайней мере 10^6 на миллилитр; однако уровни загрязнения даже

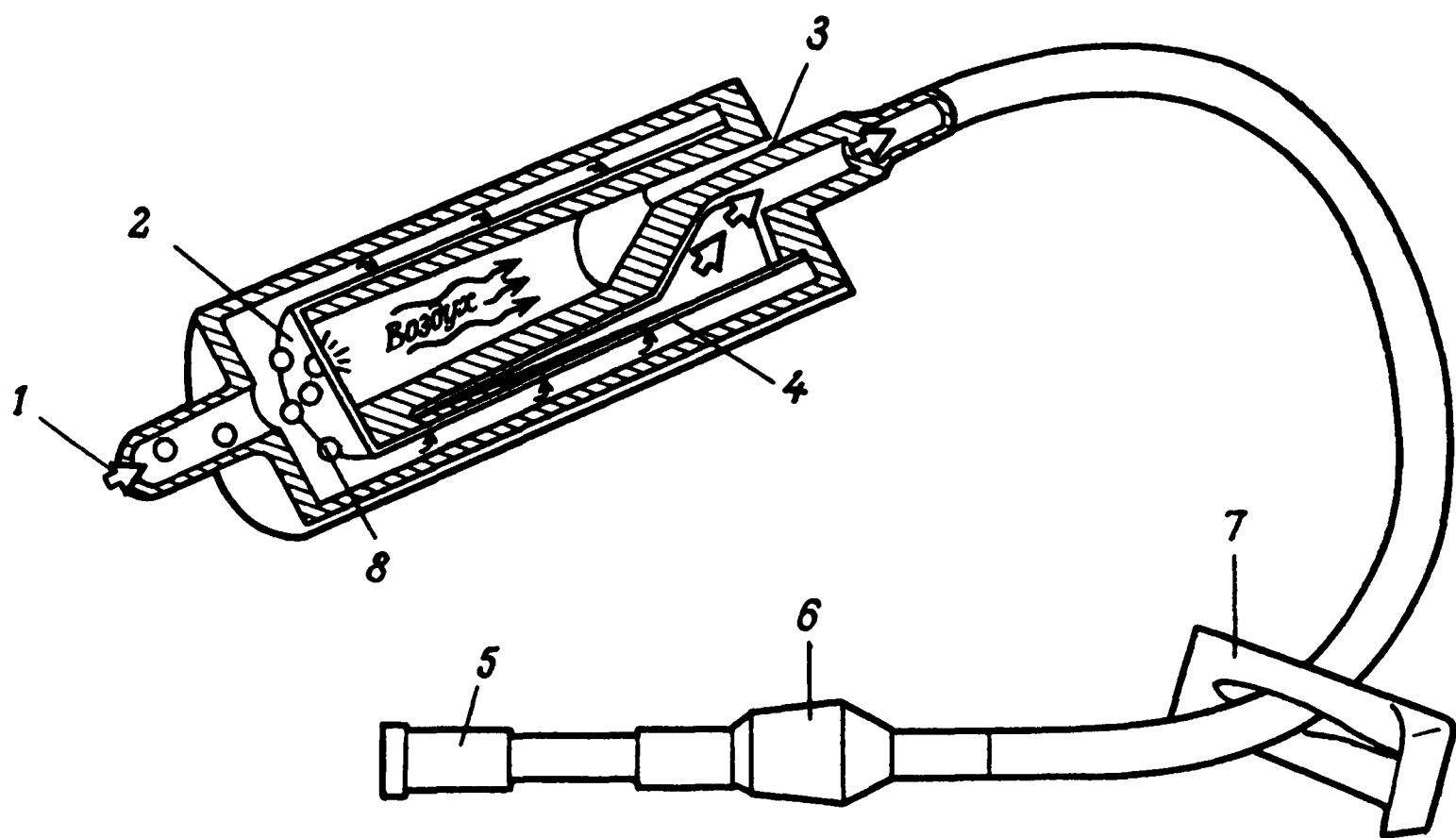


Рис. 7.8. Фильтрующее устройство Айвекс-2 с мембраной, имеющей поры размером 0,22 мкм, предназначенное для соединения с устройством для внутривенных вливаний (Займствовано из технической документации фирмы «Миллипор».) 1 — к флакону, содержащему раствор для внутривенного вливания; 2 — гидрофобная воздушная мембрана с порами 0,2 мкм; 3 — выпуск воздуха; 4 — стерилизующая мембрана с порами 0,22 мкм; 5 — переходник для иглы; 6 — резиновая груша; 7 — зажим; 8 — пузырьки воздуха.

значительно ниже этого значения могут вызвать серьезные неприятности у больного при внутривенной терапии¹. В США имеются два руководства по применению шприц-насадок в клинической практике. Одно из них подготовили Эвис и Эйкер [17] по заказу фирмы «Гелман сайенсиз», а другое опубликовано фирмой «Миллипор» (Millipore Publication MP801) под названием «Руководство по фильтрации в клинической фармацевтической практике».

При внутривенном введении лекарств мембранные фильтры в качестве окончательных можно размещать также непосредственно на аппаратуре для внутривенных инъекций. Фирма «Миллипор» изготавливает для внутривенных инъекций фильтрующие устройства Айвекс-2 (рис. 7.8), которые продаются Лабораториями Аббота. Эти устройства предварительно простерилизованы и имеют в своем составе мембрану с порами 0,22 мкм, а также гидрофобную воздушную мембрану с порами 0,2 мкм, позволяющую выводить захваченный жидкостью воздух и исключить таким образом возможность возникновения эмболии (попадания пузырьков воздуха в кровь), а также предупредить любую возможность запираания потока через мембрану воздушными пробками.

7.10. СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ В ПИВОВАРЕНИИ

В пивоварении фильтрацию применяют главным образом для того, чтобы увеличить срок хранения пива при комнатной температуре. По сравнению с фармацевтическими препаратами производство пива в том же объеме стоит значительно дешевле, а фильтрации приходится подвергать намного большие объемы жидкости. Поэтому, прежде чем применять в этом случае фильтрацию, необходимо тщательно продумать вопрос о стоимости процесса.

В пивоварении фильтрация позволяет исключить необходимость в пастеризации конечного продукта. Если бутылочное или баночное пиво не было профильтровано, то его следует подвергнуть пастеризации путем кратковременной тепловой обработки,

¹ В 1 мл инъекционного раствора может содержаться свыше 10 000 посторонних частиц. Об этом и о влиянии таких частиц на здоровье человека см. подробнее в следующих работах: *Leong A. S.-Y.* Particulate contamination in intravenous the rapy and extra corporeal systems.— *Medic. J. (Australia)*, 1982, v. 2, № 7, p. 309; *Garvan J. M., Gunner B. M.* The harmful effects of particles in intravenous fluids.— *Medic. J. (Australia)*, 1964, v. 7, № 1, p. 1.— *Прим. ред.*

чтобы убить вредные микроорганизмы, которые могли бы воспроизводиться при хранении пива. Фильтрация имеет существенное преимущество перед тепловой обработкой (пастеризацией), поскольку она сохраняет приятный вкус и аромат «бочкового» пива, что повышает его спрос среди покупателей. Стоимость же оборудования и энергетические затраты в случае использования фильтрации мало отличаются от затрат на пастеризацию, так что при правильно организованной работе фильтрационной установки фильтрация может дать некоторые практические преимущества. Однако многие из тех, кто применял мембранную фильтрацию в пивоварении, преследовали главным образом удовлетворение рыночного спроса на широко рекламируемое бутылочное пиво бочкового типа. В настоящее время не ясно, насколько широко применяется мембранная фильтрация в пивоварении.

При фильтрации пива, вообще говоря, не требуются мембраны с очень малыми размерами пор, поскольку главной ее целью является извлечение жизнеспособных дрожжевых микроорганизмов. В этом случае биологической стабилизации пива можно достигнуть и при фильтрации его через мембрану с размером пор 1 мкм [66], что позволяет пропустить через мембрану до ее забивания очень большое количество продукта. К тому же мембрана с размером пор 1 мкм имеет производительность, в 10 раз большую, чем мембрана с порами 0,2 мкм.

После того как пиво прошло стадии ферментации и старения, его сначала фильтруют через глубинный фильтр (такой, как диатомовая земля) с целью удаления большей части взвешенных твердых частиц, а затем пропускают через мембранный фильтр непосредственно в процессе разлива его по бутылкам. Фильтрация через мембрану с порами 1 мкм является вполне достаточной, если только в фильтруемом продукте не присутствуют некоторые вредные бактерии типа *Lactobacillus* и *Pediococcus*, а тогда необходимо использовать для окончательной фильтрации мембраны с порами 0,45 мкм.

Главной проблемой при фильтрации пива является забивание мембран. Особенности процесса пивоварения таковы, что время от времени в фильтруемой жидкости может оказываться много различных частиц, а также нагрузка на мембрану укорачивает ее срок службы. Другой проблемой является забивание мембран сложными веществами коллоидной структуры, такими, как клейковина (глюканы, пентозаны), образующимися из зерна и сопровождающими весь процесс получения пива. Очистку мембран от веществ такого типа можно по необходимости проводить с помощью ферментов, способных разлагать полисахариды и белки. Последние вызывают помутнение пива при его охлаждении (например, с целью удлинения срока хранения),

поэтому обработка пива ферментами может помочь решить проблему забивания; этому может помочь также правильный подбор соответствующего предфильтра.

7.11. ОСВЕТЛЕНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ВИН

Мембранная фильтрация находит также применение в производстве вин. Вообще говоря, фильтровать вина значительно проще, чем пиво, поскольку они почти не содержат высокомолекулярных полисахаридов. При мембранной фильтрации вина не только извлекаются вредные микроорганизмы, оно при этом становится прозрачным и приобретает привлекательный для потребителя вид. Другой способ обработки — пастеризация — заметно ухудшает вкус и букет вина; при фильтрации же эти качества фактически не меняются. Однако очень важно, чтобы на самой мембране не адсорбировались некоторые из ценных, придающих вкус вину компонентов.

Загрязняющими вино веществами являются дрожжи и бактерии. Некоторые из дрожжевых грибов характерны для процесса нормальной ферментации и не извлекаются при осветлении. Они могут явиться причиной повторной ферментации вина или вызвать помутнение сухих вин уже в бутылках. Наряду с этими естественными дрожжевыми грибами бывают дрожжевые грибки иного рода — они благоприятствуют кислому брожению спирта, вызывая повышение кислотности, снижение содержания алкоголя в вине и ухудшению его вкуса. Портят вино два типа бактерий — молочно-кислые и уксусно-кислые. Они устойчивы к высокому содержанию спирта в условиях высокой кислотности и способны испортить вино в течение нескольких недель. Эти бактерии необходимо удалять по той причине, что вино хранят в бутылках нередко в течение нескольких месяцев или лет.

В вине помимо микроорганизмов содержатся очень маленькие частички размерами 0,01—0,1 мкм. Они состоят из белков, полисахаридов, кристаллов солей винной кислоты и аморфных фрагментов веществ, получающихся в ходе технологического процесса. Именно все эти частицы и придают вину мутный вид. Лучшим способом их удаления является не фильтрация, а «облагораживание», заключающееся в коагуляции и отстаивании с применением специальных веществ, благоприятствующих образованию агломератов частиц. Наиболее широко применяемыми агентами такого рода являются желатин, казеин, яичный альбумин и бентонит.

Для осветления и стабилизации вин в течение многих лет употребляли диатомовую землю, перлит (вулканическое стекло),

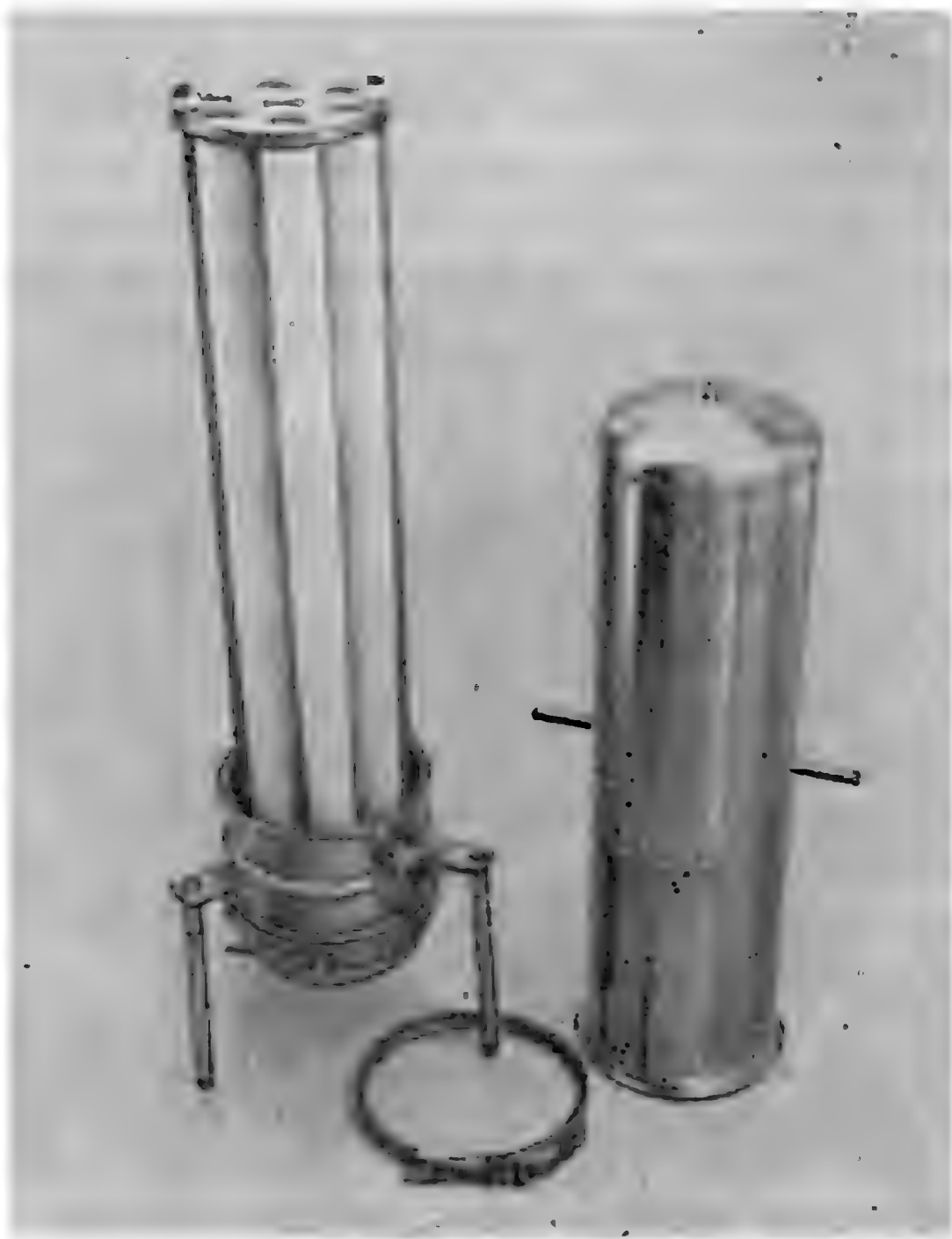


Рис. 7.9. Установка, предназначенная для фильтрации в пивоварении. Она состоит из семи фильтр-патронов, каждый длиной 100 см и диаметром 7,6 см; общая площадь фильтрующей поверхности равна 12,36 м². (С разрешения фирмы «Гелман сайенсиз».)

глубинные фильтры из волокон целлюлозы или асбеста. Хотя для осветления и стабилизации вин использовались традиционно адсорбенты и глубинные фильтры, они не всегда оказывались эффективными и поэтому стали применять мембранную фильтрацию. Мембраны обеспечивают более глубокую очистку от бактерий и нередко оказываются экономически более выгодными. Лихи и Райан [132] с целью выбора мембран, оптимальных для очистки вина, в последнее подмешивали бактерии типа *Leuconostoc oenos* и показали, что мембранный фильтр снижает концентрацию этих бактерий на 9 порядков, тогда как лучший глубинный — только на 6.

На рис. 7.9 показан общий вид многоэлементной мембранной установки, предназначенной для очистки вина и пива. Вопрос об использовании мембранных фильтров в винной промышленности все еще находится на стадии экспериментальных исследований, и пока неясно, сколь широко они будут применяться для массового производства вин. Поскольку в винном производстве имеет место такая же, как и в других областях, конкуренция, большую роль играет цена продукта. Прежде чем мембранная фильтрация завоеует общее признание, предстоит определить,

насколько качество вина, полученного очисткой на мембранном фильтре, лучше обычного, получаемого традиционными методами.

7.12. ПРОВЕРКА НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ПРИ ПОМОЩИ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ

Во многих отраслях промышленности, особенно в фармацевтической, приходится проводить испытания продукта на стерильность. Стандартный метод такого испытания состоит в том, что проба продукта помещается в питательную культуральную среду и проводится ее инкубация, при этом через некоторые промежутки времени проверяется, не произошло ли помутнения, что свидетельствовало бы о росте бактерий. Однако если в испытуемом продукте содержатся микробные ингибиторы, такие, как антибиотики или антисептики, то этот метод испытания на стерильность применять нельзя, поскольку ингибиторы препятствуют росту бактерий. До того как для проверки на стерильность начали применять мембранную фильтрацию, единственной возможностью, которая могла позволить испытать лекарственный аппарат, содержащий антимикробные агенты, на стерильность, было разбавление небольшой дозы лекарства в таком большом количестве культуральной среды, когда можно считать, что ингибитор не оказывает никакого действия. Однако из-за малости пробы при этом можно обнаружить присутствие микроорганизмов лишь в том случае, когда их очень много. В настоящее время для установления стерильности лекарств предпочитают использовать мембранную фильтрацию, чтобы выделить микроорганизмы из продукта, а затем определяют возможное присутствие жизнеспособных микроорганизмов на самой мембране, помещая ее в питательную среду. Методы мембранной фильтрации предписывается использовать согласно Фармакопее США 1979 г. [228], Европейской фармакопее 1978 г. [70], а также предписаниям Управления США по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (кодекс федеральных законов 21:436). Фармакопея США обязывает применять мембранную фильтрацию для испытания на стерильность не только продуктов, содержащих антибактериальные вещества, но и любых лекарственных средств, которые могут быть растворены в жидкости, не содержащей ингибиторы. Мембранная фильтрация рекомендуется также для проверки стерильности отдельных деталей шлангов различных медицинских устройств и инструментов, которые используются для введения стерильных лекарств. Инструмент тщательно промывают стерильным бульоном или водой, а затем промывочную

жидкость пропускают через мембранный фильтр, который после этого помещают в питательную среду и испытывают его таким образом на присутствие микроорганизмов.

Мембранная фильтрация позволяет значительно упростить методы испытания на стерильность антибактериальных агентов. После фильтрации продукта через мембрану ее промывают стерильным бульоном, чтобы вымыть любой оставшийся на ней ингибитор, а затем инкубируют в подходящей питательной среде.

Хотя мембранная фильтрация лучше всего подходит для испытаний на стерильность, для ее проведения приходится выполнять значительно более сложные операции, чем при обычных методах определения стерильности. А это приводит к существенному увеличению возможности попадания различных микроорганизмов из окружающей среды, что обесценивает результаты проверки. В Фармакопее США указывается: «Успешное применение этого метода требует исключительного искусства и высокой квалификации. При этом весьма целесообразно как можно чаще осуществлять необходимый контроль». Опыт специалистов в этой области говорит о том, что требуется несколько месяцев кропотливых занятий, чтобы с помощью мембранной фильтрации научиться получать точные и воспроизводимые результаты.

Некоторые фирмы (например, «Миллипор», «Гелман» и «Сарториус») поставляют на рынок оборудование для мембранной фильтрации, специально сконструированное для работ, связанных с испытанием на стерильность. В основном это закрытые системы, которые можно полностью простерилизовать перед использованием; через такую систему исследуемый продукт может проходить без опасения, что в него будут привнесены загрязнения извне. Риккет и Литски [168] подробно описывают применение одной из таких систем — Стеритест фирмы «Миллипор» — для определения стерильности антибиотиков. Эта система поставляется с предварительно простерилизованными элементами одноразового употребления (рис. 7.10), что позволяет уменьшить время на ее подготовку и стерилизацию. Кроме того, эта система допускает определение стерильности в двух-трех средах. Подача пробы, промывочной жидкости и культуральной среды осуществляется через игольчатые зонды и стерильные шланги одноразового употребления. Функционально системы фирм «Сарториус» и «Миллипор» аналогичны, но первая поставляется нестерильной и без заменяемых элементов.

Мембраны (с размером пор 0,45 мкм), предназначенные для испытания на стерильность растворов, содержащих ингибиторы, должны иметь гидрофобные края. Это необходимо для того, чтобы исключить подтекание ингибирующего агента под уплотняющее кольцо фильтродержателя, где он может задерживаться при последующей промывке, в то время как ингибитор, задер-

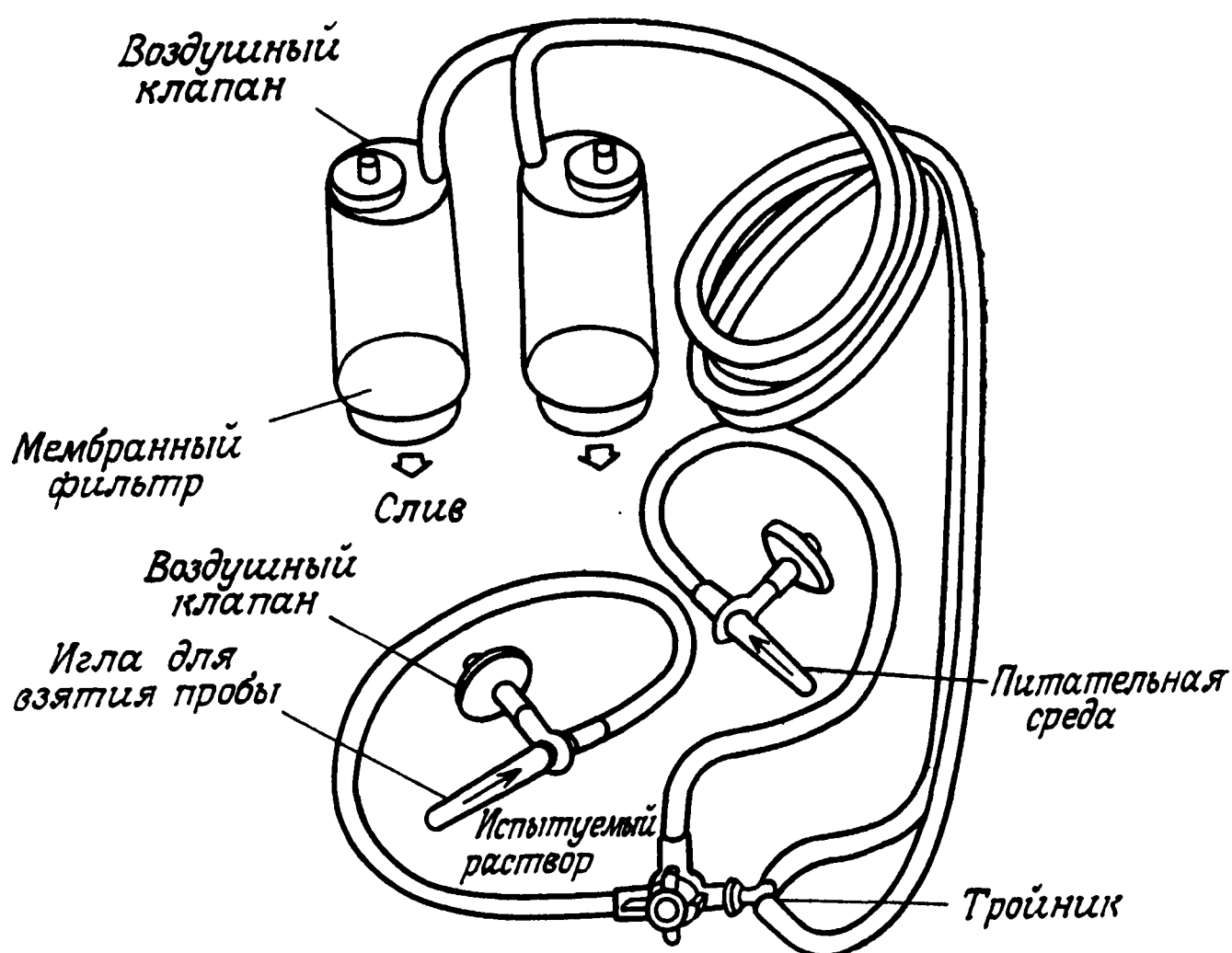


Рис. 7.10. Система Стеритест для определения стерильности антибиотиков и других лекарственных средств. Иглу для взятия пробы вводят в ампулу или флакон с испытуемым препаратом, который выпускают в приемный сосуд с помощью перистальтического насоса. Приемные сосуды снабжены мембранами с порами 0,45 мкм и гидрофобными краями. После окончания процесса фильтрации через систему пропускают промывочные растворы. Затем в каждый сосуд отдельно вводят питательную среду, трубки наверху сосуда пережимают, и начинается инкубация. Образование мути указывает на наличие загрязнений в продукте. Система, будучи полностью закрытой, исключает попадание извне загрязнений при фильтрации пробы. (Рисунок заимствован из работы [168] с разрешения фирмы «Фамэсютикл технолоджи».)

жанный матрицей мембраны, при промывке извлекается полностью. Для определения стерильности с помощью выпускаемых промышленностью установок испытуемую жидкость перистальтическим насосом подают в камеру, содержащую мембрану, а затем пропускают промывочный раствор. По завершении промывки камеры и мембраны в эту же камеру помещают питательную среду и проводят инкубацию в течение необходимого периода времени. Если промышленной установки для испытания на стерильность не имеется, то для проверки стерильности мембрану следует извлечь из фильтродержателя в стерильных условиях и поместить в соответствующую питательную среду.

Фармакопея США рекомендует два режима выращивания бактерий в питательной среде — это использование, с одной стороны, триптиказно-соевого бульона и инкубация при температуре 20—25 °С и, с другой стороны, тиогликтового бульона и инкубация при температуре 30—35 °С, причем в обоих случаях

время инкубации должно быть по меньшей мере 7 суток. Если по прошествии этого времени питательная среда не помутнеет, то следует провести так называемый «положительный» контроль. При этом каждый из сосудов системы типа Стеритест заполняется чистой культурой микроорганизмов, способных к росту в используемых средах. Отсутствие помутнения сред после инкубации может означать то, что из системы были удалены не все антимикробные агенты. Более подробную информацию о том, как следует отбирать пробы различных продуктов (или как переводить их в водный раствор), можно найти в Фармакопее США.

Испытание на стерильность других продуктов можно проводить тем же способом, что и описанный нами выше для лекарственных препаратов. Любой жидкий и фильтрующийся продукт может быть проверен на стерильность методом мембранной фильтрации. Промышленные устройства закрытого типа для определения стерильности (см. рис. 7.10) обеспечивают получение надежных результатов, поскольку они могут быть использованы для проведения анализов в асептических условиях.

7.13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе мы рассмотрели некоторые способы использования мембран с целью стерилизации жидкостей и для испытания их на стерильность. Пожалуй, не существует другой области промышленной фильтрации, в которой глубинные фильтры были бы почти полностью заменены мембранными, как стерилизация веществ, чувствительных к тепловому воздействию. Поскольку задерживающие характеристики мембраны можно сделать практически абсолютными, мы можем с уверенностью сказать, что профильтрованный через нее продукт будет стерильным.

Однако стерилизация продуктов с помощью мембранной фильтрации требует очень пристального внимания к различного рода тонкостям этого метода. Вся система, начиная с исходного фильтруемого вещества и кончая профильтрованным стерильным продуктом, должна быть тщательно выполнена, чтобы в ней не могло возникнуть никаких контактов с внешней средой. Это представляет собой чисто инженерную задачу значительной сложности. Ряд фирм, изготавливающих мембранные фильтры, поставляют на рынок свои изделия, в том числе мембраны в виде фильтр-патронов, которые можно использовать для стерилизации в промышленных условиях; эти же фирмы обеспечивают потребителя консультациями и технической помощью. Выбрав для своих целей конкретную фильтрационную систему,

потребитель должен установить с соответствующей фирмой деловые контакты.

Наряду с крупномасштабной фильтрацией, осуществляемой в промышленности, мембранная фильтрация широко используется в лабораториях для стерилизации жидкостей. Одним из наиболее важных материалов, которые стерилизуют при помощи фильтрации, являются питательные среды для культур тканей и клеток. В их составе содержатся чувствительные к тепловому воздействию компоненты, такие, как сыворотка или антибиотики, поэтому их нельзя стерилизовать автоклавированием. Осуществляя стерилизацию этих культуральных сред методом мембранной фильтрации, можно получить конечный продукт очень высокой степени чистоты. Отдельные фирмы поставляют на рынок мембраны, специально предназначенные для стерилизации культуральных сред. Эти мембраны, имеющие обычно маркировку ТС, содержат меньше экстрагируемых веществ по сравнению с другими, что способствует уменьшению количества возможных токсичных примесей в конечном продукте.

Определение стерильности продукта является важным элементом контроля качества в фармацевтической и пищевой промышленности и при производстве напитков. Для определения стерильности лекарственных препаратов, содержащих антимикробные агенты, мембранная фильтрация является лучшим методом, поскольку она позволяет извлекать примеси из продукта для определения их жизнеспособности. Еще одно преимущество мембранной фильтрации заключается в том, что объем материала, стерильность которого следует проверить, может быть очень большим; это резко повышает чувствительность метода. Специальное оборудование для проведения работ по определению стерильности продуктов выпускается несколькими фирмами, и именно это оборудование следует использовать для того, чтобы быть уверенным в достоверности результатов.

Глава 8

Мембранные фильтры, позволяющие использовать для анализа прямую спектроскопию

8.1. ВВЕДЕНИЕ

Поскольку при мембранной фильтрации суспензии большинство взвешенных в ней частиц задерживается на поверхности мембраны, для изучения и количественного определения задержанных частиц можно использовать методы микроскопического исследования. Эти методы можно применять для анализа частиц, захваченных как из газов, так и из жидкостей.

Мы неоднократно указывали на то, в чем состоит различие между глубинными фильтрами и мембранами, которые задерживают частицы главным образом на поверхности. Однако с помощью сканирующей электронной микроскопии можно обнаружить, что традиционные (нетрековые) мембранные фильтры имеют значительную глубину задержки частиц и не все уловленные ими частицы удерживаются лишь на поверхности. Поэтому в случае применения обычных мембран прямую микроскопию задержанных частиц можно проводить, только если эти частицы значительно крупнее пор, так что проникновения их внутрь поры не происходит. Поскольку частицы таких размеров исследуются довольно часто, их микроскопический анализ с использованием традиционных мембран оказывается весьма полезным. Однако если размер исследуемых частиц не намного больше размера пор, то следует применять трековые мембраны Нуклепор, которые в отличие от традиционных мембран действуют практически как поверхностные.

В настоящей главе мы рассмотрим главным образом применение мембран для биологических анализов, таких, как подсчет бактерий и обнаружение раковых клеток, а также обсудим микроскопический подсчет инертных частиц, который играет важную роль для контроля в случае промышленного производства фармацевтических средств, а также для анализа загрязнения окружающей среды. Большая часть главы будет посвящена применению мембран в случаях, когда задержан-

ные мембраной частицы можно анализировать с помощью оптической микроскопии; также отметим их использование и в случае сканирующей электронной микроскопии.

8.2. ПЕРЕВОД МЕМБРАН В ПРОЗРАЧНОЕ СОСТОЯНИЕ

Мембраны имеют достаточную толщину, а их показатель преломления совсем не такой, как у воздуха. Поэтому мембраны нельзя исследовать непосредственно под микроскопом в проходящем свете; для этого их нужно сделать прозрачными. Поскольку показатель преломления мембраны из нитро- или ацетилцеллюлозы близок к 1,5, при заполнении пор сухой мембраны маслом с тем же показателем преломления она может стать совсем прозрачной (рис. 8.1). Среди масел, которые рекомендуют для этой цели, назовем парафиновое масло или обычное иммерсионное масло для микроскопа. Для мембран из регенерированной целлюлозы можно использовать бензиловый спирт или иммерсионное масло. Мембраны черного и зеленого цвета сделать прозрачными нельзя. Многочисленные фирмы, продающие микроскопы, предлагают широкий набор масел с различными показателями преломления, так что из этого набора можно найти масло, позволяющее сделать конкретную мембрану прозрачной.

Преимущества и недостатки различных сортов масел рассмотрены Даубнером и Петером [57]. Кедровое масло, т. е. обычное иммерсионное масло, не вызывает значительной деформации мембраны и не является слишком вязким, но его нельзя использовать при получении препаратов, предназначенных для длительного хранения. Для этой цели предпочтительнее канадский бальзам, несмотря на то что он более вязок и вызывает некоторую деформацию мембраны. Если нужно провести микрофотографию препаратов, окрашенных метиленовым голубым, то в этом случае особенно хорошо подходит коричневое масло, так как оно создает интенсивный желто-зеленый контраст.

Прежде чем погрузить мембрану в масло, чтобы она стала прозрачной, ее необходимо высушить, поскольку вода, которая попала в поры в процессе фильтрации, препятствует заполнению их маслом. Если высушить мембрану нельзя, поскольку это может вызвать деформацию частиц на поверхности мембраны, то можно воспользоваться следующей процедурой, рекомендованной Американской ассоциацией здравоохранения [3]: поместите пару капель масла на предметное стекло, сверху положите влажную мембрану и добавьте поверх нее еще пару капель. Масло постепенно вытеснит воду, и через 24—48 ч



Рис. 8.1. Перевод сухой мембраны в прозрачное состояние с помощью масла с тем же показателем преломления, что и у материала мембраны. (Фото любезно предоставлено фирмой «Миллипор корпорейшн».)

мембрана станет полностью прозрачной, после чего добавьте еще немного масла и накройте прозрачную мембрану покровным стеклом.

Заметим, что во многих случаях микроскопическое исследование сделанных прозрачными мембран будет эффективным, если только частицы для увеличения контрастности были окрашены. Для каждого сорта исследуемых частиц окрашивание проводится по-разному. В разд. 8.4 мы рассмотрим, как производится окрашивание бактерий. Использование здесь фазовой микроскопии неокрашенных частиц оказывается неэффективным; даже если мембрана сделана прозрачной, ее матрица все же различима и существенно ухудшает изображение [19]. Для того чтобы можно было исследовать частицы с помощью фазово-контрастной микроскопии, мембрану необходимо растворить. Для этого было рекомендовано несколько растворителей, которые использовали Снеллен и др. [200] для изучения *Bdellovibrio*, очень маленькой бактерии. Эти растворители предназначены для мембран из смешанных эфиров целлюлозы, производимых фирмой «Миллипор», и также, надо полагать, для любых мембран из ацетил- или нитроцеллюлозы. Один такой растворитель представляет собой неполярную смесь, состоящую из равных объемов диоксана, 1,2-дихлорэтана и гексана с добавкой примерно 1 мл воды на 100 мл смеси. Растворение в этой смеси проводят при комнатной температуре, причем мембрана должна быть предварительно высушена. Другим эффективным растворителем является полярная смесь, состоящая из равных объемов полиэтиленгликоля-400 и изопропанола. Перед употреблением этот растворитель должен быть

нагрет до температуры 37°C , причем высушивать мембраны не нужно. Обработку мембраны растворителем следует проводить в термостате при температуре 37°C в течение примерно одного часа. Для исследования и подсчета даже малых бактериальных клеток можно использовать масляно-иммерсионные объективы и любой из указанных выше растворителей. В разд. 8.9 мы опишем метод получения микропрепарата на мембранах из эфиров целлюлозы, позволяющий осуществить фазово-контрастную микроскопию волокон, которые выделяют асбестовые фильтры.

Мембраны Нуклепор много тоньше, чем обычные мембранные фильтры, и являются достаточно прозрачными для большинства микроскопических исследований в проходящем свете. Они обладают двойным лучепреломлением¹ и показателями преломления 1,616 и 1,584. Лучше использовать мембраны Нуклепор с более крупными порами, поскольку мелкие поры вызывают заметное светорассеяние, что серьезно ухудшает микроскопическое изображение.

8.3. ЧЕРНЫЕ И ЦВЕТНЫЕ МЕМБРАНЫ В МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Для многих целей микроскопия в отраженном свете предпочтительнее, чем в проходящем. При использовании отраженного света мембрану не нужно делать прозрачной, но она должна отличаться по контрастности от наблюдаемых частиц. Если частицы имеют темную окраску, то можно использовать обычные белые мембраны. Многие изготовители производят также мембраны, окрашенные в зеленый или черный цвет. Эти окрашенные мембраны обычных диаметров и с порами наиболее употребительных размеров вполне доступны и предназначены для наблюдения окрашенных частиц методом микроскопии в отраженном свете.

Окрашенную мембрану можно получить самому. Например, фирма «Нуклепор» советует окрашивать выпускаемые ею мембраны в черный цвет с помощью иргалана черного, что широко используется при применении этих мембран в исследованиях с помощью флуоресцентной микроскопии (см. разд. 8.5). Краситель (Кемикл Индекс, кислый черный 107) применяется в виде раствора 2 г красителя в 1 л 2 %-ной уксусной кислоты. Мембраны перед их использованием окрашивают путем пропитки их красителем в течение нескольких часов, после чего

¹ Вследствие ориентированности исходной полимерной пленки, из которой изготавливаются эти трековые мембраны.— *Прим. ред.*

они промываются несколько раз в чистой воде, а затем сразу же запускаются в работу. Другой способ состоит в том, что мембраны высушивают на фильтровальной бумаге и сохраняют. Циммерман и др. [245] окрашивали мембраны Нуклепор в черный цвет, погружая их по меньшей мере на сутки в раствор судана черного В в 50 %-ном этаноле. Конечная концентрация красителя была 1:15 000 и он вначале был растворен в абсолютном этаноле, а затем разбавлен до необходимой концентрации дистиллированной водой. Окрашенные мембраны перед употреблением были тщательно промыты в воде.

Еще в одном способе окрашивания мембран Нуклепор в черный цвет применяют краситель Дайлон № 8, эбеновый черный [120]. Для этого 0,25 г красителя растворяют в 100 мл 0,25 %-ного водного раствора NaCl при температуре 90—95 °С и фильтруют раствор в горячем состоянии сначала через стекловолокнистый фильтр Ватман GF/F, а затем через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Мембраны окрашивают погружением на 5 мин в отфильтрованный краситель при температуре 60—70 °С с последующей промывкой дистиллированной водой и сушкой над силикагелем в вакууме.

Описанные здесь способы окрашивания поликарбонатных мембран Нуклепор в черный цвет потребитель может использовать и для окрашивания целлюлозных мембран. Следует, кстати, заметить, что черные фильтры разного производства отличаются глубиной тона (см. разд. 8.5).

8.4. ПОДСЧЕТ БАКТЕРИЙ ПОД МИКРОСКОПОМ В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ

Прямой микроскопический подсчет бактерий является важным методом в микробиологии окружающей среды, и он нашел широкое применение в исследованиях воды и почвы [57, 178, 182]. Эффективность подсчета бактерий с помощью прямой микроскопии, как правило, в 10—10 000 раз выше, чем при микробиологическом подсчете. Многие группы бактерий не поддаются микробиологическому подсчету (например, нитчатые типы и некоторые привередливые микроорганизмы, которые не растут на питательных средах), и их можно подсчитать лишь под микроскопом. Кроме того, по сравнению с микробиологическим прямой подсчет бактерий производится намного быстрее. Однако, до тех пор пока не появились мембранные фильтры, прямой подсчет применялся редко, поскольку он не обеспечивал достаточно высокую чувствительность для анализа загрязнений окружающей среды, а центрифугирование (другой метод, позволяющий концентрировать бактерии) нельзя использо-

вать для анализа проб большого объема, обычно необходимых для этого. С развитием мембранных методов оказалось возможным брать пробу по существу любого объема и подсчитывать бактерии под микроскопом, даже когда их очень немного.

Для микроскопического подсчета бактерий предпочтительнее пользоваться эпифлюоресцентным микроскопом (см. разд. 8.5). Однако, если такого микроскопа не имеется под рукой, можно использовать обычный микроскоп с наблюдением в проходящем свете. Для этого пробу нужно отфильтровать, выделенные бактерии окрасить соответствующим красителем, а мембрану сделать прозрачной (см. разд. 8.2). Этот метод подсчета бактерий широко распространен в Европе и в Советском Союзе.

С целью подсчета бактерий на мембранном фильтре в качестве красителя обычно применяют эритрозин. Даубнер и Петер [57] дают подробное описание процедуры окрашивания в этом случае. Для фильтрования подбирают объем воды, такой, чтобы всякий раз в поле иммерсионного микроскопа было видно по меньшей мере 30 окрашенных бактерий. После фильтрации быстро фиксируют бактерии пропусканием через мембрану 5 мл 5 %-ного раствора формалина (эту операцию можно не проводить, если в пробе нет патогенных бактерий). После окончательной промывки дистиллированной водой мембрану сушат на воздухе около получаса в прикрытой сверху чашке, затем переносят ее в чашку, содержащую толстую фильтровальную бумагу, насыщенную 3 %-ным раствором эритрозина в 5 %-ном феноле. Оставляют мембрану в контакте с красителем на 30 мин, затем несколько раз промывают ее водой (также с помощью фильтровальной бумаги), пока мембрана не будет иметь лишь слабый розовый цвет. При правильном приготовлении мембрана под микроскопом будет казаться бесцветной или слегка розоватой, а бактерии будут красными и хорошо контрастировать с мембраной. После окраски и высушивания мембрану делают прозрачной в иммерсионном масле и исследуют под покровным стеклом с помощью масляно-иммерсионного объектива. Замечено, что для обнаружения в поле зрения микроскопа статистически надежного числа бактерий необходимо отфильтровывать достаточное количество воды. Вообще говоря, для надежного подсчета необходимо около 30 бактерий на поле и подсчет следует вести по достаточно большому числу полей, чтобы стандартная ошибка снизилась до допустимого уровня. Некоторые общие правила статистического подсчета рассматриваются в разд. 8.8.

Метод подсчета, в котором используется окрашивание микрообъектов эритрозином, требует немалого опыта, чтобы получать воспроизводимые и удовлетворительные результаты.

Одна из трудностей состоит в том, чтобы отличить маленькие бактерии от остатков растительных тканей. Поэтому сперва желательно упорно попрактиковаться на чистых бактериальных культурах. Даубнер и Петер [57], а также Сорокин и Кадота [204] представили достаточно полные обзоры работ, в которых этот метод применялся для подсчета водных бактерий.

Прямая микроскопия применялась также для подсчета железобактерий в пробах колодезной воды [182]. Высушенные и сделанные прозрачными мембраны можно проверить на присутствие железобактерий с помощью темнопольной микроскопии. Метод прямого счета можно применять также при клинических анализах мочи, мокроты или спинномозговой жидкости. Например, Райт и Моллман [239] для обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* использовали мембраны, окрашенные кислотоустойчивым красителем.

Кроме того, мембраны можно применять для подсчета зоопланктона в пробах воды [67]. Многие виды зоопланктона можно обнаруживать даже в сухих условиях, особенно если влажная проба была изучена заранее в целях предварительной идентификации. Мембрану исследуют под микроскопом для препарировальных работ, используя сильное боковое освещение. Предпочтительнее пользоваться мембранами с отпечатанной сеткой, причем счет ведут либо на всей мембране, либо на выбранных квадратах сетки.

Подсчет частиц в напитках. Подсчет частиц представляет собой важную операцию при проведении контроля качества напитков. В напитки на любом этапе их приготовления, вплоть до закупорки в бутылки, могут попасть самые разные посторонние материалы: нити плесени, окрашенные крошки от бутылочных пробок, типографская пыль от наклеек, куски стекла, угля и резины. Чтобы провести испытание на присутствие частиц, пробу готового напитка после технологического цикла пропускают через стекловолоконный фильтр диаметром 47 мм и после окрашивания красным красителем (Понсо S) исследуют его под микроскопом в отраженном свете. Если в напитке присутствует немного частиц, которые приводят к забиванию, то вместо стекловолоконного фильтра можно использовать мембрану с размером пор 8 мкм; мембрана благодаря своей гладкой поверхности создает лучшие условия для микроскопии.

В этой операции используются стандартные стеклянные и пластмассовые фильтродержатели. Чтобы удалить любые частицы, не относящиеся к пробе, фильтровальную воронку следует тщательно промыть водой, предварительно профильтрованной с помощью мембраны. Стекловолоконный фильтр располагают ворсистой стороной вверх, чтобы уловленные

частицы лежали на возвышении и были хорошо видны. Через фильтр пропускают все содержимое бутылки или консервной банки. Как правило, стекловолоконистые фильтры не забиваются; если же это произойдет, то остаток содержимого следует отфильтровать через второй фильтр, который также нужно проверить. Краситель Понсо S используют для увеличения контрастности, однако, если напиток сам окрашивает фильтр (как, например, вишневая или апельсиновая газированная вода), надобность в этом красителе отпадает. Фильтр переносят в горизонтальном положении на подставку, стараясь избежать неосторожных прикосновений или встряхивания. Затем весь фильтр подвергают проверке под микроскопом в отраженном свете при двадцатикратном увеличении. Если возникнет необходимость в более детальном изучении исследуемых частиц, то можно прибегнуть к использованию микроскопа со стократным увеличением. Микроскопическое исследование будет более эффективным, если тщательно выполнить юстировку и фокусировку источника света.

Фильтрацию и микроскопическое исследование лучше всего проводить в лаборатории, вдали от производственных помещений. При определенном навыке прямой подсчет посторонних частиц под микроскопом может быть произведен быстро и точно, что окажет существенную помощь при осуществлении контроля качества в производстве напитков.

8.5. ПОДСЧЕТ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ ЭПИФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Этот метод наряду со всеми достоинствами метода, описанного в предыдущем разделе, обладает дополнительным преимуществом, а именно имеет значительно более высокую чувствительность и менее подвержен влиянию артефактов. В исследованиях, которые предусматривают подсчет бактерий в естественной водной среде, эпифлюоресцентная микроскопия едва не вытеснила обычную оптическую микроскопию. Однако из-за применения довольно дорогого эпифлюоресцентного микроскопа этот метод не получил широкого распространения в медицине и в исследованиях загрязнений окружающей среды. Имеется прекрасный обзор по эпифлюоресцентному подсчету бактерий, выполненный Джонсом [120].

Эпифлюоресцентный микроскоп состоит из обычного микроскопа, к которому добавлен вертикальный источник света, под действием излучения которого флуоресцирует образец (рис. 8.2). Луч света направляется через формирующий световой фильтр (выделяет только ту область спектра, которая вызы-

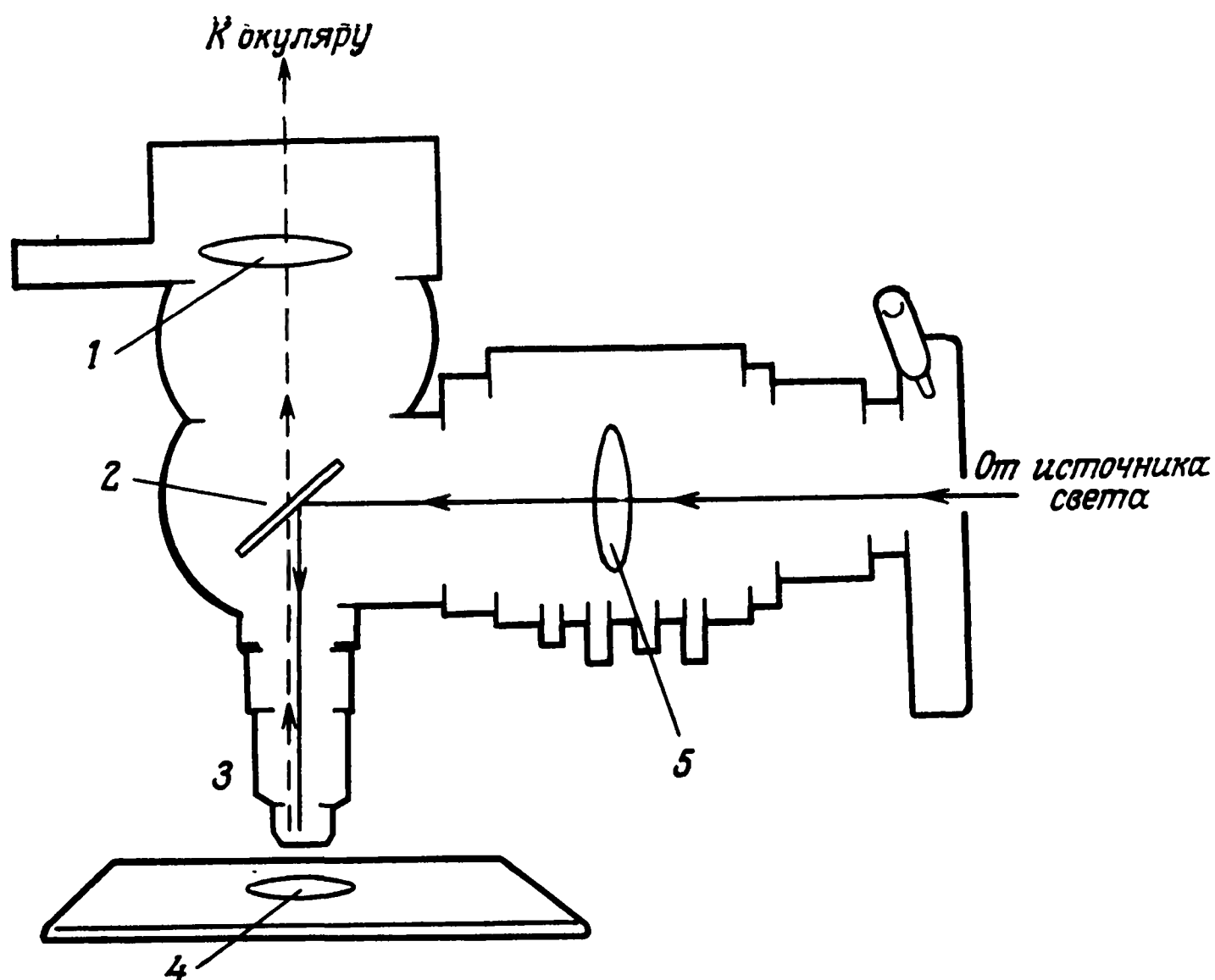


Рис. 8.2. Световой путь в эпифлюоресцентном микроскопе. 1 — светофильтр, отсекающий фоновый свет; 2 — дихроичное зеркало, направляющее падающий свет вниз через объектив на образец и пропускающее излучение флюоресценции вверх к окуляру; 3 — объектив; 4 — исследуемый образец на мембранном фильтре; 5 — формирующий светофильтр.

вает флюоресценцию образца) и затем с помощью дихроичного зеркала через объектив микроскопа попадает на образец. Образец (например, бактерии) должен быть окрашен соответствующим флюорохромным красителем, который светится под действием падающего излучения; испускаемый образцом свет собирается объективом и попадает в окуляр. Отсекающий светофильтр, расположенный непосредственно перед окуляром, пропускает излучение флюоресценции и задерживает весь падающий на него фоновый свет. Бактерии, которые ведут себя в сущности как крошечные источники света, имеют вид маленьких светящихся точек на черном фоне. Формирующий и отсекающий светофильтры, а также краситель подбираются таким образом, чтобы в отсутствие окрашенных бактерий изображение было совершенно черным. Это позволяет получить очень высокую контрастность бактерий и тем самым высокую чувствительность метода. Обычно используемый при этом краситель (акридиновый оранжевый) обладает малым сродством к большинству остатков растений, так что влияние артефактов невелико.

В описанном Франциско и др. [77] первоначальном эпифлюоресцентном методе для подсчета водных бактерий применялись обычные мембраны черного цвета, которые, по-видимому, до сих пор являются наиболее удобными. Размеры многих водных бактерий весьма малы, поэтому следует применять мембраны с размером пор 0,2 мкм. Важно, чтобы мембраны сами не флюоресцировали. Для этого необходимо проверять каждую партию мембран, так как некоторые изготовители применяют красители, которые обнаруживают значительную автофлюоресценцию. Вполне удовлетворительными были мембраны черного цвета, выпускаемые одно время фирмой «Миллипор компани», но в 70-е гг. был заменен краситель, что привело к значительному увеличению фоновой флюоресценции [56]. В настоящее время наиболее подходящими являются нитроцеллюлозные мембраны черного цвета, производимые фирмой «Сарториус» [120]. Однако потребитель должен критически относиться к некоторым изделиям, поскольку технология производства нередко меняется, о чем потребителя не ставят в известность.

Хотя некоторые специалисты для прямого микроскопического подсчета предпочитают использовать мембраны Нуклепор [55], эти мембраны, по-видимому, не имеют реальных преимуществ, если только речь не идет о ситовании. Поскольку для окрашивания мембран Нуклепор применяется флюорохромный краситель, их нужно сделать нефлюоресцирующими, что затрудняет их применение; поэтому для подсчета частиц мембраны Нуклепор можно использовать лишь в тех случаях, когда их превосходство очевидно. Джонс [120] не находит у мембраны Нуклепор по сравнению с черными мембранами фирмы «Сарториус» каких-то преимуществ при подсчете частиц эпифлюоресцентным методом, хотя Хобби и др. [108], имеющие богатый опыт прямого микроскопического подсчета частиц, рекомендуют их для применения, а Дейли [55] даже настаивает на этом. Что касается моего личного опыта, то я полностью согласен с Джонсом и считаю, что черные мембраны фирмы «Сарториус» вполне удовлетворительны.

В разд. 8.3 мы описали метод окраски мембран Нуклепор в черный цвет. Мембраны следует проверять на равномерность смачивания, так как некоторые партии мембран Нуклепор были частично гидрофобными [108], хотя эта проблема, по-видимому, была уже решена путем изменения производственного процесса [55].

Для окраски бактерий в качестве флюорохрома наиболее часто применяется акридиновый оранжевый при конечной концентрации (в воде) 0,01 %, хотя используются также изотиоцианат и диацетат флюоресцеина, а также эухризин (другой

акридиновый). Окрашивание обычно производят добавлением к водной пробе 0,1 объема раствора акридинового оранжевого (концентрация в 10 раз выше конечной), что позволяет провести окрашивание в течение нескольких минут, после чего смесь пропускают через мембрану. Чтобы гарантировать равномерный поток воды через мембрану Нуклепор, которая имеет очень небольшую толщину, ее помещают поверх либо другой мембраны (любого типа), либо куска мелкой нейлоновой сетки, либо же серебряного мембранного фильтра Селас [245]. Можно также использовать специально для этого предназначенные фильтродержатели фирмы «Нуклепор». Более толстые черные мембраны фирмы «Сарториус» не нуждаются ни в специальном держателе, ни в дополнительном нижнем фильтре.

Хобби и др. [108] предложили метод, согласно которому бактерии подсчитываются во влажном состоянии. После того как вся вода прошла через мембрану (промывка необязательна), ее помещают на предметное стекло микроскопа, добавляют каплю масла, кладут сверху покровное стекло и снова добавляют каплю иммерсионного масла, для того чтобы можно было использовать иммерсионный объектив.

Циммерман и Мейер-Рейл [244] предложили другой подход, а именно изопропанольный метод получения сухого препарата. Согласно этому методу, необходимость в черных мембранах отпадает, поскольку краситель, связавшийся с мембраной Нуклепор, все равно обесцвечивается изопропанолом. Водную пробу без красителя фильтруют досуха, после чего мембрану, не вынимая ее из фильтродержателя, обрабатывают 0,5 мл водного раствора акридинового оранжевого (1:10 000) в течение 1 мин. Краситель затем удаляют, отфильтровывая его под вакуумом через мембрану в слив, после чего добавляют и таким же образом (т. е. отфильтровывая под вакуумом) немедленно удаляют 1 мл изопропанола. После этого мембрану снимают с фильтродержателя, сушат на воздухе, режут на куски клиновидной формы и устанавливают на предметном стекле, покрытом фиксирующей смесью (коричный альдегид и эвгенол в соотношении 2:1). Чтобы избежать постепенного высвобождения несвязанного красителя из остатков растительной ткани, что приводит к уменьшению контрастности, с помощью фильтровальной бумаги под покровное стекло затягивают немного больше фиксирующей смеси, которая замещает тем самым жидкость, содержащуюся в частицах бактерий. Хотя этот метод и более громоздкий, чем упомянутый выше метод Хобби и др. [108], с его помощью получают препараты, которые могут храниться сравнительно долго, что избавляет от необходимости проводить счет бактерий сразу после их фильтрации.

Существует еще один метод, который может быть удобен для взятия проб в полевых условиях. В этом методе мембрану высушивают сразу же после фильтрации без ее окрашивания [55]. Позднее мембраны окрашиваются и вновь увлажняются прямо на стеклах для счета с помощью разбавленного раствора акридинового оранжевого. Такой способ исключает проблему переноса водных проб, взятых в полевых условиях, но, прежде чем применять его в конкретной обстановке, его необходимо проверять для надежности.

Большинство исследователей, применяющих эпифлюоресценцию для счета, указывают, что фиксация водных проб в формальдегиде или глутаровом альдегиде позволяет их сохранять долгое время. Однако Дейли [55] рассматривает некоторые возможные осложнения, связанные с фиксацией и вызванные порчей альдегида при окислении. Он рекомендует применять 5 %-ный раствор свободного от кислоты глутарового альдегида в буфере, очищенном для предотвращения окисления аргоном.

Хобби и др. [108] дают рекомендации в отношении того, как следует выбирать элементы оптической системы микроскопа (формирующий и отсекающий светофильтры, дихроичное зеркало). При работе с акридиновым оранжевым формирующий светофильтр должен пропускать свет в голубой области спектра (420—430 нм), а отсекающий светофильтр отсекает весь свет с длинами волн меньше 500 нм. При этих условиях в отсутствие флюоресценции изображение будет совершенно черным. Следует заметить, что для успешной работы должны использоваться надлежащие светофильтры и источник света большой мощности (ртутная лампа мощностью 200 Вт). Поскольку соответствующее оборудование выпускается многими фирмами, мы не приводим здесь конкретных рекомендаций. (За подробностями читатель может обратиться к работе [120].) Потенциальному покупателю мы можем лишь посоветовать, чтобы он не принимал на веру рекомендаций изготовителя или агента по продаже, а обязательно проверил прибор сам, прежде чем его приобрести. Поскольку в большинстве случаев эпифлюоресцентную микроскопию применяют для биомедицинских исследований без применения мембранных фильтров, когда имеют дело с флюоресцирующими антителами, соответствующее оборудование производится прежде всего для этих целей.

Для того чтобы можно было правильно и быстро производить счет, окуляр должен быть снабжен сеткой. Ее помещают в окуляре строго в фокальной плоскости. Большинство изготовителей продают окуляр с регулируемым фокусом, что особенно удобно при работе с сеткой.

Следует также подчеркнуть, что объектив микроскопа, используемый для эпифлюоресцентного счета, должен обладать способностью пропускать максимальное количество света. Фазово-контрастные объективы с вделанными в них фазовыми пластинками, как правило, для этого непригодны. Среди объективов, предназначенных для микроскопии методом светлого поля, нужно выбрать тот, который имеет большую числовую апертуру. Однако сильное увеличение не только не нужно, но даже нежелательно, поскольку оно влечет за собой снижение интенсивности изображения. Лучше пользоваться маломощными окулярами. По сравнению с обычной микроскопией флюоресцентная микроскопия так же, как и темнопольная, позволяет разглядеть клетки значительно меньших размеров, поскольку каждая клетка в этом случае представляет собой точечный источник света. Многие затруднения при эпифлюоресцентном счете, которые упоминаются в литературе [55, 108], могут быть вызваны как ошибками при самом микроскопическом исследовании, так и тонкостями процесса мембранной фильтрации. Если соблюдены все предосторожности, то под микроскопом мы увидим ярко светящиеся бактерии на совершенно черном фоне (рис. 8.3).

Как и в случае применения для исследований просвечивающей световой микроскопии (см. разд. 8.4), в флюоресцентном методе для достижения статистически достоверных результатов счету необходимо подвергнуть достаточно большое число клеток и полей. Обычно подсчитывают по меньшей мере 10 случайно выбранных полей, содержащих в общей сложности как минимум 200 бактерий. Если бактерий слишком мало, то фильтрации следует подвергнуть большие объемы воды. Однако необходимость в фильтрации более чем 10—50 мл воды возникает редко. Например, при использовании дисковой мембраны диаметром 25 мм для обеспечения равномерного распределения на ней бактерий нужно брать по крайней мере 2 мл воды. Чем меньше объем фильтруемой жидкости, тем больше клеток будет накапливаться у внешнего края мембраны из-за действия сил поверхностного натяжения. Дейли [55] указал, что возникающая при этом ошибка в подсчете полного числа бактерий в единице объема растет, пока объем фильтруемой пробы не достигнет примерно 5 мл¹. Если плотность бактерий очень высока, следует разбавить водную пробу предварительно отфильтрованной водой. Дополнительные подробности метода можно найти в работах [55, 108, 120.]

¹ К сожалению, автор не указывает здесь фильтрующей поверхности мембраны.— *Прим. ред.*

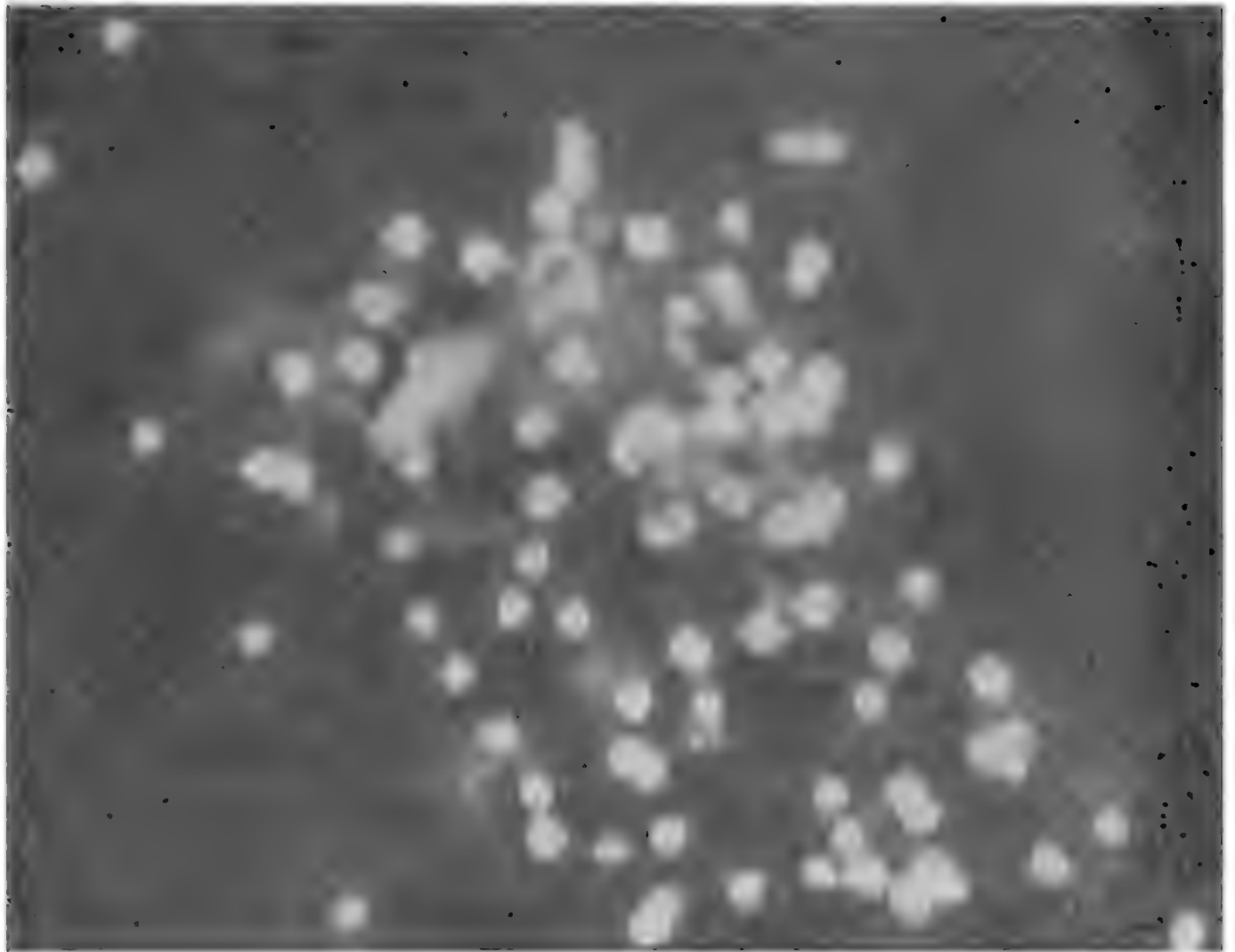


Рис. 8.3. Микрофотография бактерий на черном мембранном фильтре, полученная эпифлюоресцентным методом. Увеличение 1500X. (Неопубликованное фото Б. Б. Болула и Т. Д. Брока.)

Следует сделать важное замечание, относящееся к подсчету бактерий с помощью как эпифлюоресцентной микроскопии, так и микроскопии в проходящем свете! Растворы и другие материалы, используемые в процессах окраски и фильтрации, сами могут содержать бактерии, которые будут уловлены на мембране или фильтре и подсчитаны. Действительно, бактерии могут расти в разбавленных растворах красителей при хранении. Поэтому весьма существенно, чтобы все растворы красителей, а также вода, используемая для любого разбавления, были предварительно отфильтрованы через мембраны или фильтры, имеющие те же размеры пор, что и используемые в окончательном анализе. Стерилизация автоклавированием не позволяет избавиться от бактерий, и поэтому их можно подсчитать под микроскопом. Самое лучшее, что можно сделать, — это предварительно отфильтровать все растворы и затем хранить их в стерильных контейнерах, извлекая из них в стерильных условиях небольшие пробы для ежедневной работы.

Петтифер и др. [167] описывают несколько модифицированный эпифлюоресцентный метод для подсчета бактерий в сыром молоке. Молоко представляет собой особенно трудную для анализа жидкость. Дело в том, что через мембранный фильтр

до его забивания можно пропустить лишь небольшой объем молока (0,01 мл), а чтобы достичь чувствительности, достаточной для бактериального счета, нужно профильтровать по меньшей мере 2 мл молока. Петтифер и др. предлагают с целью улучшения фильтрационной способности молока обрабатывать его протеазой с последующим разбавлением каким-либо поверхностно-активным веществом. Главная цель такой обработки состоит в том, чтобы лизировать попавшие в молоко клетки ткани животного, которые намного крупнее бактерий и количество которых может быть примерно таким же, как и количество бактерий. Читатель, подробно интересующийся этим вопросом, может обратиться к статье [167].

8.6. МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ ПОДСЧЕТ ФИТОПЛАНКТОНА В ПРОХОДЯЩЕМ СВЕТЕ

Фитопланктон — это водоросли, которые свободно плавают в озерах и океанах. Они много крупнее бактерий, так что к микроскопии здесь предъявляются меньшие требования, но, поскольку плотность их популяции обычно невелика, для пробы приходится брать большие объемы воды. Поскольку объем фильтруемой воды можно регулировать в зависимости от плотности популяции фитопланктона, для подсчета последнего весьма удобно использовать мембранную фильтрацию.

Применение мембранной фильтрации для подсчета фитопланктона впервые описал Мак-Набб [150], а Американская ассоциация здравоохранения [3] на основе этого описания разработала стандартный метод. Этот метод не рекомендуется использовать в тех случаях, когда плотность популяции слишком высока или когда велико количество остатков растительных тканей, поскольку мембрана быстро забивается, а ил может разрушить микроорганизмы или скрыть их от наблюдения. Метод особенно хорошо подходит для вод с низкой плотностью фитопланктона и в тех случаях, когда в воде имеется много мелких организмов, которые должны быть сосчитаны при большом увеличении. Однако мембранную фильтрацию нельзя применять в случае очень чувствительных видов, которые могут разрушиться в процессе сушки (для этого случая в разд. 8.7 описан более подходящий метод).

В рассматриваемом здесь методе используются белые мембраны из эфира целлюлозы диаметром 25 мм с размером пор 0,45 мкм. Фиксированная в иодсодержащем растворе Люголя¹ водная проба фильтруется через мембрану при сравнительно слабом вакууме (менее 0,5 атм). Пока мембрана еще

¹ Состав раствора Люголя: 1 г иода, 2 г иодида калия, 3 г дистиллированной воды, 94 г глицерина.— *Прим. ред.*

влажная, ее помещают на предметное стекло, содержащее пару капель иммерсионного масла, и еще пару капель наносят поверх мембраны. Масло постепенно пропитывает мембрану, делая ее прозрачной, причем этот процесс занимает от 24 до 48 ч. Как только мембрана станет прозрачной, добавляют еще несколько капель масла и кладут сверху покровное стекло, после чего мембрану можно исследовать под микроскопом в проходящем свете. Такое постепенное осветление мембраны позволяет уменьшить вред, наносимый чувствительным разновидностям фитопланктона.

Стандартный метод Американской ассоциации здравоохранения не предусматривает окрашивания клеток фитопланктона, но, если в качестве фиксатора используют раствор Люголя, он сам до некоторой степени окрашивает эти клетки. Оуэн и др. [164], а также Фурнье [76] описывают методы окрашивания, позволяющие повысить контраст изображения. Метод Оуэна и др., разработанный для пресноводного фитопланктона, включает в себя фильтрацию через целлюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм и последующее окрашивание кислым фуксином. Фитопланктон на мембране окрашивается в течение 20 мин красителем из 1 г кислого фуксина в 100 мл воды, содержащей 2 мл уксусной кислоты. После окрашивания мембрану (все еще расположенную в фильтродержателе) промывают водой и затем обесцвечивают и обезвоживают, промывая последовательно 50-, 90- и 100 %-ным пропанолом (который не действует на ацетилцеллюлозные мембраны, но действует на нитроцеллюлозные). Затем мембрану осветляют ксилолом и оставляют ее на фильтродержателе в течение 10 минут. После этого мембрану вынимают из фильтродержателя и во влажном виде помещают в консервирующий раствор. В качестве последнего рекомендуется Пермаунт, который перед пропиткой мембраны нагревают на предметном стекле в течение 10 секунд при температуре 55 °C. Подготовленный таким образом препарат можно длительно хранить; при этом края покровного стекла нужно загерметизировать лаком. При работе с правильно подготовленным препаратом можно использовать иммерсионный объектив. Авторы особенно рекомендуют этот метод для изучения диатомовых водорослей и утверждают, что его можно применять также и для других видов фитопланктона.

Фурнье [76] описывает методы применения мембранной фильтрации для исследования морского фитопланктона. Дело в том, что морские виды фитопланктона часто намного более чувствительны, чем пресноводные, и имеют очень маленькие размеры и низкую плотность популяции. Для предварительной концентрации чувствительных видов фитопланктона удобно применять обратную мембранную фильтрацию (см. разд. 11.6).

Фурнье рекомендует использовать дисковые ацетилцеллюлозные мембраны диаметром 25 мм с размером пор от 0,45 до 0,8 мкм (поскольку размер мельчайшей известной фитопланктонной водоросли *Micromonas pusilla* не меньше 0,8 мкм). Фитопланктон фиксируется глутаровым альдегидом или формальдегидом. Объем воды, который нужно отфильтровать, меняется в зависимости от концентрации фитопланктона; Фурнье рекомендует 25 мл для вод эстуария, 50 мл для прибрежных океанских вод и 150 мл для открытого моря. Вакуум, используемый для фильтрации, должен быть низким, не более чем 1/6 атм (125 мм рт. ст.). При этом для предохранения чувствительных видов фитопланктона от разрушения нельзя допускать высыхания мембраны. Когда на мембране остается 1—2 мл воды, мембрану промывают последовательно морской водой со все большей степенью разбавления (75, 50, 25 и 10 %) и в заключение дистиллированной водой, приведенной к рН 7,1—7,5 добавлением разбавленного гидроксида аммония. Затем материал на мембране обезвоживается последовательными промывками 10, 30, 50, 75 и 95 %-ным этанолом (заметьте, что ацетилцеллюлозные мембраны устойчивы к этанолу, а мембраны из нитроцеллюлозы и смешанных эфиров целлюлозы к нему неустойчивы). Мембрану покрывают спиртовым раствором красителя стойкого зеленого (0,1 % в 95 %-ном этаноле) и выдерживают в таком состоянии примерно 20 мин. Затем через мембрану пропускают раствор красителя и после этого мембрану промывают 10—15 мл абсолютного этанола. Хотя окрашивание красителем стойким зеленым не обязательно, оно облегчает локализацию микроорганизмов на мембране и позволяет лучше отличить обломки клеток от мелких жгутиковых организмов. Затем мембрану вынимают из фильтродержателя и помещают на предметное стекло, на которое было нанесено несколько капель осветляющего агента (например, канадского бальзама). Мембрана становится прозрачной менее чем за 10 мин, после чего ее переносят на другое предметное стекло, на котором находятся несколько капель толуола или ксилола, и накрывают покровным стеклом. После сушки при комнатной температуре или в сушильном шкафу при температуре около 40 °С препарат готов для счета.

8.7. ПОДСЧЕТ ФИТОПЛАНКТОНА С ПОМОЩЬЮ ЭПИФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Эпифлюоресцентный метод широко использовался в нашей лаборатории [40] для счета фитопланктона на пресноводном материале, но его можно применять также к пробам морской

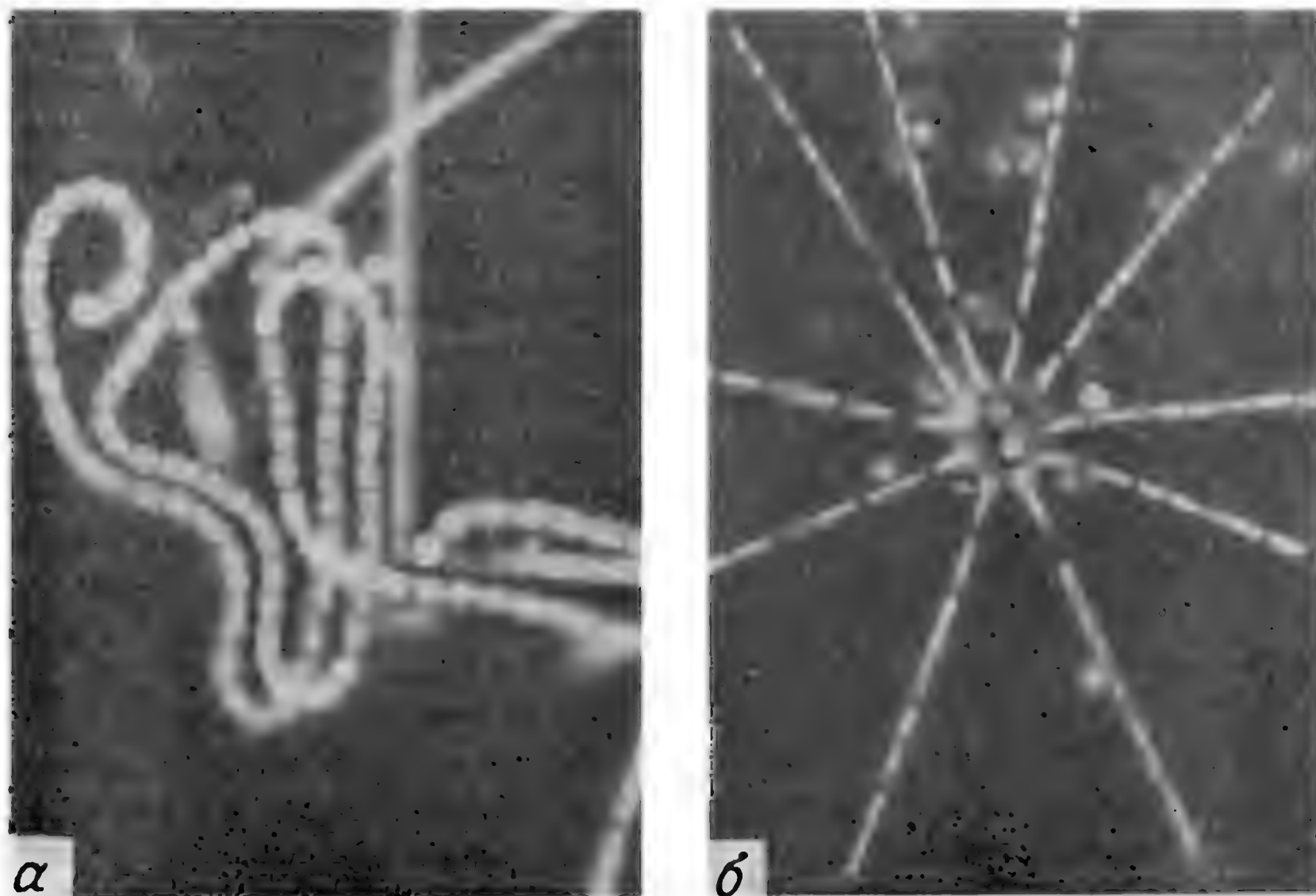


Рис. 8.4. Эпифлюоресцентная микроскопия фитопланктона после окраски примулином. *а* — сине-зеленые водоросли *Anabaena*, увеличение 375 $\times$; *б* — диатомея *Asterionella*, увеличение 250 $\times$. (Микрофотография Т. Д. Брока.)

воды. Эпифлюоресценция имеет при подсчете фитопланктона те же преимущества, что и при подсчете бактерий: простоту, высокую чувствительность и способность обнаруживать очень мелкие разновидности. Поскольку хлорофилл флюоресцирует в красной области, фитопланктон можно отличить от видов, не содержащих хлорофилл, а также от погибшего фитопланктона по красному свету, который он испускает. Однако в более крупном фитопланктоне хлоропласт, содержащий хлорофилл, может занимать лишь небольшую часть клеточного объема, так что собственная флюоресценция сама по себе еще не позволяет идентифицировать вид. В этом случае для окраски внешних структур клеток фитопланктона приходится прибегать к флюорохромному красителю. Хотя для этой цели годятся, по-видимому, многие флюорохромы, мы использовали примулин (Кемикл индекс 49 000), который используется для окраски материалов, содержащих полисахариды. Он эффективно окрашивает внешнюю поверхность клетки и при этом практически не маскирует собственную флюоресценцию хлорофилла. Фитопланктон, фиксированный формальдегидом, окрашивается в нефiltroванной водной пробе добавлением к ней примулина. Пробу пропускают затем через мембрану (лучше всего брать черные

нитроцеллюлозные мембраны фирмы «Сарториус» диаметром 25 мм с размером пор 0,45 мкм), после чего мембрану без промывки помещают еще во влажном состоянии на предметное стекло. Небольшая пропеллерная мешалка, установленная в фильтровальной воронке над самой мембраной (но не касающаяся ее!), обеспечивает равномерное распределение фитопланктона над поверхностью мембраны. На мембрану наносят каплю дистиллированной воды (морской, если речь идет о проверке морской воды), кладут сверху покровное стекло и сразу же исследуют мембрану. Как подчеркивалось в разд. 8.5, при использовании эпифлюоресцентного метода важное значение имеет тщательный подбор объектива. При подсчете мелких видов фитопланктона подходит масляно-иммерсионный апохроматический 40-кратный объектив, а для более крупных видов можно использовать 10-кратный объектив любого типа. В некоторых случаях идентификация фитопланктона эпифлюоресцентным методом вызывает затруднения, поэтому имеет смысл проводить идентификацию обычных сырых препаратов перед их подсчетом, используя предпочтительно фазово-контрастную микроскопию. Если определенные виды, присутствующие в данной среде, обнаружены и идентифицированы, не составит труда подсчитать их с помощью эпифлюоресценции. На рис. 8.4 приведены примеры получаемых таким образом изображений.

8.8. ЗАМЕР И ПОДСЧЕТ ИНЕРТНЫХ ЧАСТИЦ

Загрязнение пылью представляет собой одну из основных проблем в аэрокосмической и электронной отраслях промышленности; простой и чувствительный метод контроля содержания пыли в окружающей среде обеспечивает мембранная фильтрация. Кроме того, важной проблемой является исследование загрязнения механическими частицами жидкостей, используемых в узловых компонентах гидравлических систем аэрокосмического оборудования. Анализ содержания частиц имеет очень большое значение также при крупномасштабном производстве парентеральных препаратов в фармацевтической промышленности.

Применение в аэрокосмической промышленности. Методы использования мембранной фильтрации для анализа частиц в аэрокосмической промышленности детально описаны в стандартах Американского общества по испытанию материалов (ASTM D 2009, E20, F24, F25, F312 и F318); обзоры этих методов представили Прессвуд и др. [172]. Методы ASTM посвящены определению количества частиц и распределению их по

размерам в воздухе, жидкостях и на поверхностях с помощью прямой микроскопии. Эти методики не предназначены для подсчета частиц или определения их размеров, если диаметр частиц меньше чем 5 мкм. Конкретная процедура взятия пробы зависит от того, берется ли эта проба из воздуха, из воды или с поверхности какого-либо объекта.

При анализе воздуха используют фильтродержатели, предназначенные для отбора аэрозольных проб, например изготавливаемые фирмами «Миллипор» и «Гелман». При этом используют черные мембраны из эфира целлюлозы диаметром 47 мм с размерами пор 0,8 мкм и с нанесенной квадратной сеткой. Поток воздуха через мембрану необходимо управлять таким образом, чтобы все частицы были уловлены, а скорость потока не превышала 1 л/(мин · см²). Применение мембранных фильтров для отбора проб воздуха мы подробно рассмотрим в гл. 14. Для анализа жидкостей следует выбирать такую мембрану, которая не подвергается действию данной жидкости (вопросы химической совместимости мы обсуждали в разд. 4.5). При анализе поверхностей объект помещают в чистый стакан объемом 500 мл, содержащий 200 мл дистиллированной, отфильтрованной через мембрану воды, к которой добавлено 0,1 % неионного детергента. Стакан накрывают пластиковой пленкой, помещают в аппарат для ультразвуковой очистки и обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин. Водный экстракт фильтруют через черную мембрану из эфира целлюлозы диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм. Во время проведения всех процедур фильтрации и анализа особое внимание следует уделить чистоте оборудования: вся стеклянная посуда, контейнеры для хранения и фильтродержатели должны быть очищены с помощью ультразвука в горячей воде, содержащей детергент. Время от времени нужно использовать чистые контрольные мембраны, чтобы иметь уверенность в том, что уровень загрязнения в аналитической лаборатории удовлетворителен.

Микроскопическая проверка мембраны с содержащимися на ней частицами проводится в отраженном свете. Согласно стандарту ASTM D 2009, увеличение объектива при этом должно равняться

$$700/d,$$

где d — средний диаметр (в мкм) собранных частиц, которые подвергаются счету. Таким образом, используется сравнительно низкое (50—200-кратное) увеличение, т. е. к микроскопии предъявляются не слишком жесткие требования. Для 50-кратного увеличения подходит 10-кратный окуляр и 5-кратный объектив с числовой апертурой 0,15. Для 100-кратного увеличения

используют 10-кратный объектив с числовой апертурой 0,25, а при 200-кратном—20-кратный объектив с числовой апертурой 0,50. При увеличениях более чем в 500 раз следует применять масляно-иммерсионные объективы. При этом обычный стереомикроскоп для препаровальных работ не подходит. Источник света с фокусирующим конденсором должен обеспечивать высокую интенсивность света и быть рассчитанным на переменное напряжение; его располагают вне микроскопа. Свет должен быть тщательно сфокусирован на мембране под косым углом, и особое внимание нужно уделить тому, чтобы получить необходимый контраст. Для сканирования мембраны необходимо иметь механический столик, причем для калибровки системы следует использовать микрометр столика. В окуляр вставляется специальная размерная сетка, названная *сеткой Портона* [1, 172], с контрольными метками, которая может быть откалибрована для исследуемых размеров от 5 до 100 мкм в зависимости от увеличения применяемого микроскопа (рис. 8.5). Размер каждой частицы определяется сравнением ее с одной из калиброванных меток на сетке. Первыми подсчитываются самые крупные частицы, а затем последовательно все более мелкие. В каждом поле под микроскопом частицы подсчитываются по размерам в следующем порядке: больше 100 мкм (включая волокна), от 50 до 100 мкм, от 25 до 50 мкм, от 15 до 25 мкм, от 5 до 15 мкм. Частицы с размерами меньше 5 мкм этим методом подсчитывать не следует.

Прежде чем начать подсчет частиц, необходимо провести сканирование мембраны при увеличении в 50 раз или меньше, чтобы убедиться в случайном распределении частиц на ее поверхности и подобрать соответствующий объектив. В стандартах F25 и F312 описываются некоторые точные методы подсчета, и их следует внимательно изучить.

Эффективность подсчета частиц зависит от цвета мембраны, поскольку контрастные частицы обнаружить легче. Выбор белого, зеленого или черного цвета мембраны определяется природой изучаемых частиц.

Статистические соображения, относящиеся к счету и определению размера частиц, рассмотрены в стандартах ASTM D 2009 и F312. Существует общее правило, согласно которому число полей, просматриваемых под микроскопом, можно вычислить следующим образом. Произведение общего числа частиц в каждом диапазоне размеров на число подсчитанных полей должно быть равно 1000. Если подсчитанное число частиц оказалось слишком малым, счет продолжают до тех пор, пока не будет подвергнут счету 1 % площади всей фильтрующей поверхности мембраны.

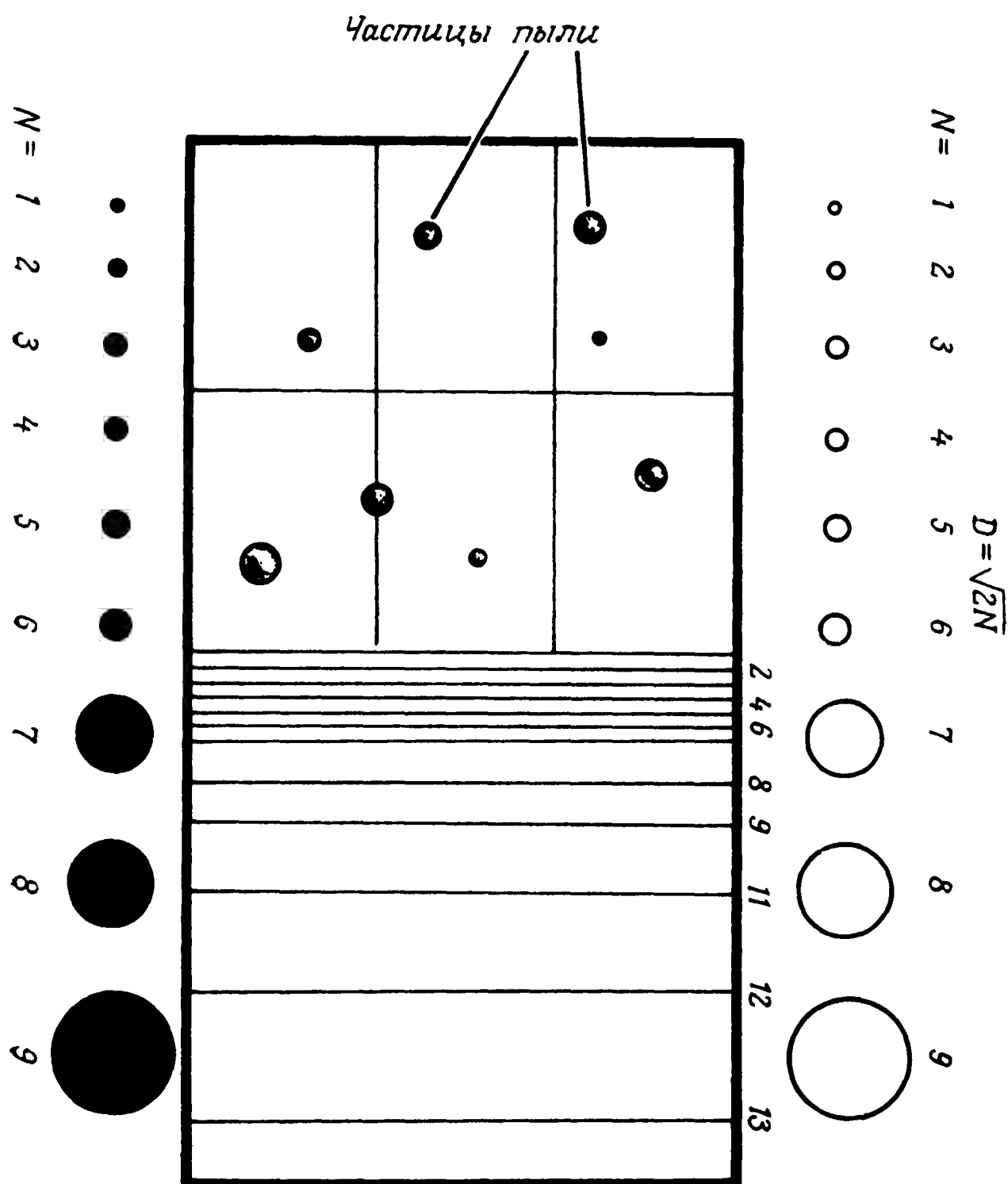


Рис. 8.5. Использование сетки Портона для подсчета частиц. Кружки служат для быстрой оценки размеров частиц. При подсчете частиц в воздухе применяют лишь ту половину сетки, которая содержит 6 больших прямоугольников. При увеличении $400\times$ диаметр самого маленького кружка равен примерно 1 мкм. Диаметр каждого последующего кружка удваивается через один; например, кружок № 3 имеет диаметр вдвое больше, чем кружок № 1.

Применение в фармакологии. В дополнение к испытаниям на стерильность, описанным в разд. 7.12, фармацевтические растворы, предназначенные для парентерального введения, должны быть проверены на присутствие нежизнеспособных микроорганизмов и инертных частиц, которые могут вызвать осложнения при введении таких препаратов пациентам. Хотя для оценки количества частиц можно использовать и автоматический подсчет с помощью электронных устройств, прямой микроскопический подсчет является даже более предпочтительным благодаря своей простоте и тому, что он позволяет как идентифицировать частицы, так и определить размеры любой из них.

Здесь действует тот же общий принцип, что и при проверке

жидкостей, используемых в аэрокосмической технике; однако для каждого конкретного типа исследуемой жидкости он несколько модифицируется. Для парентеральных препаратов используют мембраны с размером пор 0,8 мкм. Всю работу по приготовлению проб и анализу необходимо выполнять в исключительно чистых условиях, причем решающие операции должны проводиться в специальном боксе с ламинарным потоком воздуха, снабженном воздушными фильтрами сверхвысокой эффективности. Прежде чем использовать стеклянную посуду и инструменты, которые должны быть идеально чистыми, реагенты необходимо отфильтровать через мембранные фильтры с размером пор 0,8 мкм. Даже при самом тщательном соблюдении чистоты возможно присутствие отдельных загрязняющих частиц, поэтому наряду с мембранами, используемыми в исследованиях, должны быть подготовлены для анализа чистые контрольные мембраны. Результаты, полученные при подсчете частиц на контрольных мембранах, рассматриваются как фоновые и вычитаются из результатов испытаний. Однако, если на контрольной мембране обнаружено более чем 5 частиц, рабочие условия считаются неприемлемыми, а результаты испытаний — недостоверными.

Перед фильтрацией испытуемой жидкости содержимое контейнера должно быть хорошо перемешано. Затем 25 мл продукта отфильтровывают под вакуумом через мембранный аппарат с размером пор мембраны 0,8 мкм. После этого мембранный аппарат промывают отфильтрованной водой объемом 25 мл, причем эту воду потом пропускают через мембрану. Мембранный аппарат осторожно разбирают, а вынутую из него мембрану помещают на тщательно вымытый фильтродержатель для микроскопического исследования.

Микроскопическое исследование проводят в отраженном свете с общим увеличением в 100 раз. Проверке подвергается вся поверхность мембраны, причем частицы подсчитываются по размерам в двух диапазонах: не менее 10 мкм и не менее 25 мкм. Величины частиц оценивают по их наибольшему линейным размерам. Подсчитывают число частиц на миллилитр пробы в каждом из двух диапазонов размерных величин. В случае проверки больших объемов парентеральных препаратов число частиц после вычитания числа частиц на контрольной мембране не должно превышать 50 на миллилитр при их линейных размерах не менее 10 мкм и 5 на миллилитр при размерах не менее 25 мкм.

Поддержание соответствующих рабочих условий при подсчете частиц. Чтобы быть уверенными в том, что окружающие условия пригодны для проведения операций по подсчету частиц, следует соблюдать следующие общие правила:

1. Не курить в помещении.
 2. Нельзя вносить в рабочее помещение никаких материалов из картона или бумаги.
 3. Контейнеры с пробами, которые вносятся в рабочее помещение, должны быть вымыты перед взятием пробы.
 4. Перед работой в помещении руки должны быть тщательно вымыты, а при их загрязнении тотчас вымыты снова.
 5. Никогда не следует держать руки или лицо над фильтровальной воронкой или над открытыми контейнерами с пробами.
 6. Все ответственные операции нужно выполнять только в чистом боксе и чистыми руками.
 7. Выполнять операции по возможности в глубине бокса.
 8. Поддерживать бокс чистым и свободным от посторонних материалов.
 9. Система циркуляции воздуха внутри бокса должна все время поддерживаться в рабочем состоянии, а воздушные фильтры в боксе необходимо менять как можно чаще.
- Необходимо особо подчеркнуть, что оператор должен строго следить за чистотой помещения, чтобы окружающий воздух не содержал никаких посторонних частиц, мешающих проведению исследований.

8.9. ПОДСЧЕТ АСБЕСТОВЫХ ВОЛОКОН

В тех отраслях промышленности, где используются большие количества асбеста, он может стать существенным фактором загрязнения окружающей среды; поэтому контроль за находящимися в воздухе асбестовыми волокнами имеет решающее значение для предотвращения профессиональных заболеваний. В США Национальный институт охраны труда и здоровья (НИОТЗ) предписывает стандартный аналитический метод для сбора, подготовки к микроскопическому исследованию и подсчета асбестовых волокон на мембранах из эфиров целлюлозы [156]. Этот метод предусматривает, что в костюм каждого сотрудника, находящегося в помещении с асбестовым загрязнением, вмонтирован насос, работающий от батареек; с помощью его окружающий воздух подается на мембранный фильтр (см. гл. 14). Через определенные промежутки времени мембрану вынимают из аппарата, проводят операцию по ее освещению и затем с помощью фазово-контрастного микроскопа измеряют и подсчитывают асбестовые волокна. При этом асбестовым волокном считается любая макрочастица, длина которой превышает 5 мкм, причем она должна быть по крайней мере в три раза больше диаметра. Хотя это определение, по видимому, включает не только асбестовые волокна, оно позво-

ляет на разумной основе решать вопросы охраны здоровья в отраслях промышленности, использующих в своих производствах асбест.

Для подсчета асбестовых волокон рекомендуется использовать мембрану из эфира целлюлозы с размером пор 0,8 мкм. Ее устанавливают в специальном прозрачном пробоотборнике (аэрозольном полевом контрольном устройстве) одноразового пользования. Утвержденный НИОТЗ пробоотборник продается фирмой «Миллипор компани», он представляет собой устройство, состоящее из мембраны диаметром 37 мм, плотно укрепленной между двумя секциями и имеющей под собой тонкую целлюлозную подложку для равномерного распределения потока жидкости по поверхности мембраны. Фильтродержатель пробоотборника снабжен сверху и снизу патрубками для подсоединения его к вакуумному насосу. Мембраны могут быть белыми или черными, с нанесенной на них сеткой или без нее. Поскольку число фоновых частиц должно быть известно, фирма «Миллипор» указывает на каждой упаковке, содержащей мембраны с сеткой, среднее число фоновых частиц.

Пропускаемый через мембрану объем воздуха должен определяться уровнем загрязнения, и стандарт НИОТЗ дает подробные рекомендации по различным аспектам, например: как нужно закрепить пробоотборник на костюме сотрудника или какие статистические параметры вычисляются при подсчете частиц. При этом очень строго нужно следить за тем, чтобы любое оборудование для анализа, включая предметные и покровные стекла, было чистым. Подсчет фоновых частиц должен быть проведен с использованием в точности той же процедуры, что и при исследовании пробы. Для статистической достоверности рекомендуется, чтобы минимум было подсчитано 100 волокон или 20 полей зрения микроскопа, а оптимальная плотность волокон составляла от 1 до 5 волокон на поле зрения, в котором производится отсчет.

Важной особенностью метода является использование специальной жидкости для заключения препаратов (этап подготовки препаратов для микроскопических исследований). Она состоит из смеси равных количеств диметилфталата и диэтилоксалата, к 1 мл которой добавлено 0,05 г материала неиспользованной мембраны. Целью здесь является получение раствора для заключения препаратов такой вязкости, чтобы мембрана в нем растворялась, но миграция частиц в процессе растворения была минимальной. После растворения мембраны в жидкости для заключения препаратов частицы должны распределиться по поверхности предметного стекла примерно так же, как они были распределены на поверхности мембранного фильтра.

По окончании времени, за которое берут пробу, разделяют

среднюю и нижнюю секции пробоотборника и высвобождают мембрану. Из мембраны с помощью тщательно очищенного скальпеля от центра к краю вырезают треугольный клин. Если для выполнения этой операции мембрану необходимо вынуть из фильтродержателя, то делают это весьма осторожно, чтобы избежать любого загрязнения. С помощью тщательно очищенного пинцета вырезанную клиновидную часть мембраны помещают на предметном стекле микроскопа поверх слоя фиксирующей жидкости таким образом, чтобы сторона мембраны с отобранной пробой оказалась наверху. При этом фиксирующая жидкость заранее распределяется на предметном стекле с помощью стеклянной палочки таким образом, чтобы занимаемая ею площадь имела форму треугольника, соответствующего по размерам вырезанной клиновидной части мембраны. После того как указанная часть мембраны была помещена поверх фиксирующей жидкости, сверху осторожно кладут чистое покровное стекло, стараясь не сдвинуть и не встряхнуть мембрану. С того момента как покровное стекло коснулось мембраны, его положения менять не следует. Мембрана становится прозрачной через 15 мин, и пробу необходимо подвергнуть счету в течение двух дней.

Счет проводят под фазово-контрастным микроскопом с 40—45-кратным объективом с числовой апертурой 0,65—0,75. Следует применять 10-кратные окуляры, а источник света должен допускать кёлеровское освещение образца. Препарат помещают на механический столик и подвергают счету, сканируя поверхность мембраны вдоль радиуса от одного конца до другого. Поля зрения выбирают случайным образом, не глядя в окуляр, и важно в процессе счета настроить фокус над неровностями поверхности мембраны, т. е. примерно на 10—15 мкм над ней. Если речь идет об асбесте, находящемся в воздухе, большинство его волокон не отвечает определению НИОТЗ, так как их размеры, как правило, меньше чем 1 мкм. Для определения размера таких волокон рекомендуют пользоваться специальной сеткой Портона (см. рис. 8.5).

Установлены следующие правила для подсчета: 1) подсчет вести на стольких полях зрения, чтобы полное число волокон составляло по меньшей мере 100; 2) даже если подсчитано более 100 волокон, продолжать счет, чтобы по меньшей мере было проверено 20 полей; 3) прекратить счет по достижении 100 полей, даже если не насчитано 100 волокон; 4) включать в счет любое волокно, которое лежит в пределах пространства, подвергаемого счету; 5) считать за половину волокна любое волокно, которое находится в пределах области счета лишь одним своим концом; 6) не включать в счет волокна, пересекающие две стороны области счета.

Полное число волокон на единицу объема воздуха вычисляется по следующей формуле:

$$C = \frac{(N/n - N_k/n_k) S}{G \cdot t \cdot s},$$

где C — концентрация (см^{-3}) находящихся в воздухе волокон; N_k — общее число волокон, подсчитанных на n_k полях контрольной мембраны; n_k — общее число полей, подсчитанных на контрольной мембране; S — эффективная площадь (мм^2) поверхности исследуемой мембраны; для 37 мм мембраны со средним диаметром 33 мм мы имеем $S=855 \text{ мм}^2$; G — скорость потока воздуха, создаваемая насосом (л/мин); N — общее число волокон, подсчитанное на n полях; n — общее число полей, подвергаемых счету на мембране; s — общая площадь (мм^2) поверхности полей, подсчитанных под микроскопом (как правило, $s=0,003—0,006 \text{ мм}^2$); t — время сбора пробы в минутах.

В силу технических особенностей подсчета асбестовых волокон, а также того, какое внимание уделяется этому подсчету со стороны правительства, НИОТЗ опубликовал весьма подробное описание предписываемого ею метода подсчета. Метод счета, описанный выше, представлен нами в сильно сокращенном виде как пример практического использования мембранных фильтров для прямого микроскопического счета в небиологической области. Многие из принципов, установленных стандартом НИОТЗ и отмеченных здесь, могут принести пользу в многочисленных случаях применения микроскопического счета.

8.10. ПОДСЧЕТ РАКОВЫХ КЛЕТОК (ЭКСФОЛИАТИВНАЯ ЦИТОЛОГИЯ)

Мембранные фильтры находят широкое применение в обнаружении раковых и других аномальных клеток, полученных из жидкостей организма или других образцов, в которых плотность клеток низка. К жидкостям и материалам, которые могут быть взяты на исследование с помощью мембранных фильтров, относятся: амниотическая жидкость, перитонеальная жидкость, костный мозг, бронхиальные отсосы и промывания, соскобы из полости рта, бурсальная жидкость, спинномозговая жидкость, промывания из толстой кишки, кистозные и эндометриальные отсосы, пищеводные соскобы и промывания, глазные промывания, отсосы с помощью тонкой иглы (из легких, щитовидной железы, печени, поджелудочной железы, лимфатических узлов, кисты, слюнных желез, груди, простаты), желудоч-

ные соскобы и промывания, плевральная жидкость, синусные промывания, синовиальная жидкость, моча, промывания мочевого пузыря и влагалища. Мембранные фильтры служат для концентрирования клеток в тех жидкостях, где их содержание мало, а осевшие на мембране клетки могут непосредственно исследоваться методом оптической микроскопии. Клетки должны быть окрашены, а мембраны сделаны прозрачными. Благодаря использованию мембранных фильтров чувствительность анализа во многих случаях может быть более высокой, чем при нанесении клеток на предметное стекло прямо из мазка или при их концентрировании с помощью центрифуги.

Можно применять как мембраны Нуклепор, так и традиционные мембранные фильтры. Некоторые исследователи считают, что следует отдавать предпочтение ацетилцеллюлозным мембранам, поскольку они задерживают меньше краски, чем нитроцеллюлозные, однако использование мембран из смешанных эфиров с преобладанием нитроцеллюлозы также было небезуспешным. Мембраны Нуклепор не задерживают краску, но их поры остаются видимыми в подготовленном образце, что может вызывать раздражение у некоторых исследователей. Прежде чем применять мембраны из эфиров целлюлозы, им надо дать предварительно набухнуть, погрузив их в 95 %-ный этанол на 10—15 секунд. Такая обработка помогает уменьшить образование на мембранах складок и морщин в процессе приготовления образца. Мембраны Нуклепор не нуждаются в предварительном набухании, но их следует увлажнить в физиологическом растворе. Незначительная шероховатость мембран из эфиров целлюлозы может способствовать адгезии клеток в процессе их окрашивания, что ведет к более полному их выделению.

Можно использовать мембраны диаметром как 25, так и 47 мм с порами размером 5 мкм; поры такого размера задерживают клетки, пропуская в то же время большую часть их обломков. Мембрану следует с краю пометить несмываемыми чернилами (для этой цели подходят некоторые шариковые ручки). Исследуемая жидкость под вакуумом фильтруется через мембрану, которая затем промывается физиологическим раствором. (Фирма «Гелман компани» продает устройство под названием Цитосив, который состоит из фильтодержателя с уже вложенной в него мембраной, так что пробу можно пропускать непосредственно через мембрану, используя шприц.) Клетки сразу же фиксируют на мембране, не удаляя ее из фильтодержателя, добавлением 50—60 мл 95 %-ного раствора этанола в фильтровальную воронку. Через 1 мин этанол удаляют, а мембрану помещают в стеклянную чашку с 95 %-ным раствором этанола, чтобы продолжить фиксирование по мень-

шей мере в течение 15 мин. Эта процедура, помимо обычных преимуществ (сохранение структуры клеток в процессе окраски и приготовления препаратов для микроисследований) имеет ту особенность, что оператор при этом защищен от возможного вредного действия пробы. Важно, чтобы в процессе фильтрации и окрашивания мембрана находилась во влажном состоянии, поскольку в противном случае может произойти разрушение или деформация клеток. После фиксации мембрану нужно окрашивать как можно быстрее, поскольку чем дольше она находится в спирте, тем больше вероятность того, что клетки начнут отрываться от нее и всплывать. В процессе окрашивания следует избегать перекрестного загрязнения, так как всплывшие клетки из проб со злокачественным ростом могут стать причиной неверного положительного заключения. Чтобы этого не произошло, каждую мембрану нужно окрашивать в своей собственной чашке. Фирма «Гелман компани» выпускает прибор под названием Цитохолдер, который предназначен для крепления 47 мм мембраны в процессе фиксации и окрашивания.

Процедура окрашивания представляет собой модифицированную процедуру с использованием гемотоксилина, подобную той, что нашла применение в обычной клинической цитологии. После того как клетки окрашены и должным образом обесцвечены, мембрана обезвоживается в абсолютном этаноле. Существенно, чтобы вся вода была удалена на этой стадии, иначе на следующей стадии мембрану не удастся сделать достаточно прозрачной. Чтобы мембрану сделать прозрачной, ее помещают в ксилол, а затем в раствор для заключения препаратов. Фирма «Миллипор» продает прямоугольные мембраны, которые без разрезания устанавливаются непосредственно на предметном стекле микроскопа. После этого мембрана накрывается покровным стеклом и высушивается в течение 15—20 мин при температуре 50 °С.

В случае использования мембран Нуклепор их необходимо растворять в хлороформе, так как их нельзя сделать достаточно прозрачными. После того как клетки на мембране окрасились, ее помещают на сухое предметное стекло той стороной, на которой находятся клетки, и промакивают досуха. Стекло надписывают и вместе с мембраной кладут на абсорбирующую пористую подложку в чашку Петри, после чего всю поверхность мембраны равномерно заливают хлороформом. Мембрана растворяется, а задержанные ею клетки прилипают к предметному стеклу, после чего их вместе с предметным стеклом погружают в ксилол и затем помещают в жидкость для заключения препаратов.

Детальное описание цитологических методов оценки наличия

злокачественных клеток выходит за рамки этой книги. Опытные цитологи и патологоанатомы готовят и исследуют препараты, используя методы, аналогичные описанным здесь.

8.11. «ОКРАШИВАНИЕ» С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

В разд. 8.5 и 8.7 мы описали методы флюорохромного окрашивания микробных клеток, задержанных мембранными фильтрами. Для окрашивания клеток, содержащих антиген, комплементарный антителу, можно также использовать флюоресцирующие антитела. Эта процедура является очень простой. Клетки, задержанные на черной мембране (при этом нужно убедиться, что собственная флюоресценция мембраны незначительна), окрашивают, поместив на нее каплю соответствующего флюоресцирующего антитела, разбавленного до необходимой концентрации, чтобы исключить неспецифическое окрашивание. Мембрану, расположенную на предметном стекле, выдерживают во влажной атмосфере (например, в чашке Петри с влажным куском фильтровальной бумаги) около часа, затем мембрану промывают фосфатно-буферным солевым раствором и заключают под покровное стекло в глицерин с буферным раствором. Подсчет ведут с помощью эпифлюоресценции, как описано выше.

Использование мембранных фильтров позволяет проверить образцы воды или почвы на присутствие отдельных серотипов по сути любого микроорганизма, даже при низкой концентрации последнего. Этот метод применялся также [122] для обнаружения в воздухе малых концентраций некоторых бактерий.

8.12. СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Мембранные фильтры существенно облегчают изучение микроорганизмов и других частиц с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Хотя при этом можно пользоваться традиционными мембранами, более предпочтительными являются мембраны Нуклепор благодаря тому, что они имеют очень гладкую поверхность и поры строго определенного диаметра. Такие поры позволяют осуществлять внутреннюю калибровку увеличения, а гладкая поверхность создает намного большую контрастность и не столь мешающий наблюдению фон в сравнении с сетчатой матрицей целлюлозных фильтров. Мембранные фильтры для сканирующей электронной микроскопии получили теперь исключительно широкое признание.



Рис. 8.6. Микрофотография водных бактерий и водорослей, уловленных мембраной Нуклепор, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Размер пор мембраны 5 мкм, увеличение 2100 $\times$. (Неопубликованная микрофотография К. Педрос-Алио и Т. Д. Брока.)

Мембрана с пробой фиксируется в буферном растворе глутарового альдегида обычными методами (выбирают ту методику фиксирования, которая подходит для исследуемых микроорганизмов). После промывки мембрану подвергают стандартной операции высушивания, затем нижней стороной ее закрепляют на держателе образцов для СЭМ и после этого покрывают металлом. На рис. 8.6 представлен пример изображений, получаемых таким способом.

8.13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей главе мы описали ряд методов, которые позволяют использовать мембранные фильтры для прямого микроскопического исследования микроорганизмов и частиц в пробах из окружающей среды. Для этих исследований мембраны

оказались необычайно эффективными, поскольку они дают возможность сконцентрировать частицы даже в тех пробах, где их содержание весьма низко. Однако наличие матрицы у мембраны приводит к значительному ухудшению микроскопического изображения, что заставляет исследователя подбирать для конкретного изучаемого материала соответствующий метод микроскопии. Благодаря осветлению мембран можно применять сравнительно недорогие микроскопы, но при этом во многих случаях качество изображения оказывается невысоким. Использование эпифлюоресцентной микроскопии либо с флюорохромными красителями, либо с флюоресцирующими антителами открывает путь к намного более прецизионному и чувствительному анализу, но при этом приходится иметь дело с дорогим оборудованием.

Следует подчеркнуть, что исследование клеток и макрочастиц на осветленных мембранных фильтрах при большом увеличении требует большего внимания к юстировке микроскопа, чем исследование тех же объектов на обычных предметных стеклах, так как материал самой мембраны вызывает некоторое ухудшение изображения. Чтобы получать воспроизводимые количественные результаты, необходимо приобрести значительный опыт. При меньших увеличениях, которые используются для анализа частиц в фармацевтической промышленности и при контроле загрязнения воздуха, требования к микроскопии не столь высоки, но необходимо весьма тщательное приготовление пробы, чтобы избежать загрязнения мембраны.

По существу для ряда микроскопических исследований применение мембранных фильтров стало необходимым. Сюда можно отнести их использование для контроля частиц асбеста в воздухе, для целей эксфолиативной цитологии, в производстве растворов для парентерального введения, для обнаружения находящихся в воздухе макрочастиц в тех производствах, где их присутствие крайне нежелательно, например в электронной и аэрокосмической отраслях промышленности.

Глава 9

Подсчет жизнеспособных микроорганизмов

9.1. ВВЕДЕНИЕ

Метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов с помощью мембранных фильтров характеризуется высокой чувствительностью и простотой. Это привело к тому, что мембранные фильтры стали широко применяться в исследованиях качества воды, и к тому, что они стали производиться промышленностью. В настоящей главе мы рассмотрим общие принципы и методы применения мембранных фильтров для подсчета жизнеспособных микроорганизмов. В следующей главе мы обсудим вопросы специфического применения мембранных фильтров для анализа воды.

Применение мембранных фильтров для подсчета жизнеспособных микроорганизмов основано на том, что при пропускании подлежащего испытанию вещества (воздух, вода, фармацевтический препарат) через мембрану микроорганизмы задерживаются на ее поверхности. Если плотность микроорганизмов на мембране невелика, то прямую микроскопию (см. гл. 8) использовать нельзя. Однако, если мембрану поместить в культуральную среду, последняя проникнет в поры, доставит микроорганизмам питательные вещества и даст им возможность вырасти в колонии, видимые невооруженным глазом. Подсчитав колонии, выросшие на поверхности мембраны после соответствующего инкубационного периода, можно получить число жизнеспособных микроорганизмов, которые были задержаны мембраной.

Такой подсчет микроорганизмов на мембранном фильтре аналогичен общепринятому методу подсчета на чашках, но значительно чувствительнее, поскольку через мембрану можно пропускать пробы почти неограниченного объема. Во многих случаях из-за низкой плотности микроорганизмов обычный подсчет на чашках просто невозможен, и применение здесь мембранных фильтров привело к настоящей революции. До введения в практику мембранных фильтров подсчет микроорганизмов при их низкой плотности мог быть осуществлен только

с помощью громоздкой и дающей невысокую точность процедуры «многих пробирок», или метода «наиболее вероятного числа» (НВЧ). Сравнение методов подсчета с помощью НВЧ и с использованием мембранных фильтров показало, что в большинстве случаев последний при той же чувствительности дает более точные результаты и оказывается намного более удобным в работе.

9.2. СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕМБРАНЫ ДЛЯ ПОДСЧЕТА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для подсчета жизнеспособности микроорганизмов наиболее общеприняты мембраны из эфира целлюлозы с размером пор 0,45 мкм. Можно использовать также мембраны из нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы и смешанных эфиров целлюлозы.

В результате многочисленных исследований, особенно микроорганизмов, подвергшихся воздействию стрессовых факторов (см. разд. 10.6), было показано, что для подсчета микроорганизмов идеальная структура пор мембран должна быть такой, чтобы отдельные клетки отчасти захватывались внутрь пор, а не располагались непосредственно на поверхности мембраны. Идеальная мембрана для подсчета микроорганизмов должна обладать определенной степенью анизотропии (см. разд. 2.3), причем размеры пор на верхней стороне мембраны должны быть больше среднего диаметра ее пор. При этом клетки задерживаются частично внутри матрицы мембраны, где они менее подвержены вредному влиянию неблагоприятных факторов, например высушиванию при контакте мембраны с воздухом или нехватке питательных веществ. Этот эффект получил название «эффекта колыбели» (англ. *cradling*) [35], и подсчет жизнеспособных микроорганизмов на таких мембранах оказывается значительно более эффективным (см. также работу [124]). Поскольку мембраны Нуклепор задерживают микроорганизмы исключительно на своей верхней гладкой поверхности, они непригодны для целей подсчета жизнеспособных микроорганизмов¹.

Очень трудно решить, какая конкретная марка или тип мембраны лучше всего подходит для данной задачи. Американское общество по испытанию материалов разработало стандартный тест для этой цели (см. в работе [35] обсуждение некоторых трудностей при разработке такого стандарта), который

¹ В своем каталоге 1984 г. фирма «Нуклепор корпорейшн» рекомендует использовать для этих целей изготавливаемые ею трековые мембраны.—
Прим. ред.

был опубликован как ASTM D 3508 (см. разд. 10.6). Подсчеты микроорганизмов производят на выбранном мембранном фильтре и затем сравнивают их с результатами подсчетов, полученными при посеве на чашках; чтобы можно было использовать метод посева на чашках, берут водные пробы из загрязненных источников, неочищенных сточных вод или из другого источника, где популяция жизнеспособных микроорганизмов достаточно высока. Главная цель стандарта ASTM состоит в том, чтобы соответствующие фирмы-изготовители могли определить, насколько производимые ими мембранные фильтры годятся для использования их в испытаниях на ФКП (см. разд. 4.9). Однако этот метод получил более широкое распространение для определения того, насколько тот или иной тип мембраны лучше всего подходит при исследовании конкретного микроорганизма или вида пробы.

Для подсчета микроорганизмов размер пор мембраны вовсе не обязательно выбирать, исходя из того, чтобы он был чуть меньше самых мелких микроорганизмов, которые должны быть подсчитаны. Поскольку меньшие поры не позволяют микроорганизмам проникнуть внутрь поры, условия для их выделения могут быть хуже, чем в случае, когда размер пор несколько больше размера исследуемого микроорганизма [198]. Следует отдавать себе отчет в том, что требования к мембранным фильтрам для целей подсчета совсем другие, нежели те, которые предъявляются к мембранам, предназначенным для стерилизации (см. гл. 7).

Большинство изготовителей производят мембраны с маркированной сеткой, что облегчает подсчет бактериальных колоний. На первых порах для нанесения сетки на мембранах использовалась краска, которая иногда оказывала токсическое действие на некоторые микроорганизмы, что приводило к заниженным результатам в сравнении с немаркированными мембранами. Токсическое действие маркировочных сеток может быть выявлено по прекращению интенсивного роста колоний, примыкающих к нанесенным на мембране линиям. В дополнение к токсичности, вызванной краской, определенное ингибирование роста на маркированных мембранах может быть вызвано механическим действием толстых маркировочных линий на развитие колонии, а также потому, что сетка препятствует диффузии к микроорганизмам питательных веществ [82]. Можно полагать, что в настоящее время благодаря высокой конкуренции между фирмами, производящими мембранные фильтры, все изготовители маркированных мембран проверяют качество своей продукции и при работе с ними теперь не возникает затруднений. Однако потребитель всегда должен учитывать те проблемы, которые могут возникнуть при использовании мем-

бран с маркировочной краской. Если мембран с нанесенной сеткой не имеется в наличии или же их нельзя использовать по упомянутым выше причинам, то для подсчета колоний можно применить увеличительное стекло с разметочной сеткой.

Для подсчета цветных колоний (наподобие тех, что растут на индикаторной питательной среде) предпочтительно использовать белые мембраны, а для подсчета белых или полупрозрачных колоний лучше всего подходят черные мембраны. Некоторые фирмы продают черные мембраны с сеткой, нанесенной белой краской.

Для проверки на стерильность антибиотиков и других бактериостатических агентов необходимы мембранные фильтры с нанесенными гидрофобными краями (см. разд. 7.12). Гидрофобный край предотвращает затекание ингибитора в ту часть мембраны, которая контактирует с уплотняющей кромкой фильтродержателя. Любой ингибитор, проникший в эту часть мембраны, нельзя было бы полностью вымыть при последующей ее промывке стерильной водой, и он вместе с мембраной был бы перенесен в чашку с питательной средой, в которой благодаря его присутствию мог бы затормозиться рост культуры. Выпускаются мембраны с гидрофобными краями, шириной 3 или 6 мм и со стандартными размерами пор, используемыми обычно при испытаниях на стерильность (см. гл. 7).

9.3. МЕТОД ПОДСЧЕТА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Использование мембранных фильтров для подсчета микроорганизмов подробно рассматривали Даубнер и Петер [57], а также Американская ассоциация здравоохранения (АРНА) [3]. Применение того или иного конкретного метода подсчета в значительной степени определяется тем, какой вид микроорганизмов подсчитывается.

При подсчете жизнеспособных микроорганизмов важнейшую роль играет соблюдение стерильности и проведение операций в асептических условиях. Пробы следует собирать в стерильные сосуды и выполнять все операции в условиях, соответствующих естественной среде обитания данного микроорганизма. Как сама мембрана, так и детали мембранного аппарата, которые будут находиться в контакте с пробой, должны быть также стерильными. Фильтродержатель может быть сделан из стекла или из нержавеющей стали, и обе его части нужно стерилизовать отдельно, завернув в плотную бумагу. В лабораторных условиях стерилизацию лучше всего проводить в автоклаве, а в полевых — отдельные детали для стерилиза-

ции можно промыть метанолом (или этанолом), и затем его поджечь. Приемная колба не нуждается в стерилизации, поскольку она расположена под мембраной. Сами мембраны должны стерилизоваться перед употреблением, лучше всего в автоклаве. Мембраны могут поступать в продажу в предварительно стерилизованных упаковках или в так называемых «пакетах для автоклава», которые не стерильны, но упакованы таким образом, чтобы их можно было легко обработать в автоклаве. Каждый пакет для автоклава содержит десять мембран диаметром 47 мм с размером пор 0,45 мкм и десять мягких пористых подложек того же диаметра. Пористые подложки, пропитанные культуральной средой, служат для бактерий источником питательных веществ при последующей инкубации мембраны (см. ниже). Если пакеты для автоклава отсутствуют, то пачки мембранных фильтров могут быть помещены в маленькие стеклянные чашки Петри, которые заворачиваются в плотную бумагу и автоклавируются в течение 10 мин при температуре 121 °C с последующим быстрым стравливанием давления, чтобы снизить влагообразование. Фирма «Гелман» выпускает пакеты для автоклава, у которых край конверта, содержащего мембраны, при автоклавной обработке изменяет цвет.

Последовательность действий при подсчете жизнеспособных микроорганизмов. Основание фильтродержателя вставляют в открытом виде в вакуумную колбу. С помощью стерильного пинцета с плоскими концами (для стерилизации пинцет можно окунуть в спирт, который затем поджигают) из стерильного пакета достают мембрану и устанавливают ее в основании фильтродержателя, сверху осторожно располагают стерильную воронку и закрепляют ее зажимом (рис. 9.1). Водную пробу пропускают через мембрану под вакуумом, причем, прежде чем вылить пробу в воронку, ее следует хорошо перемешать. В конце фильтрации вакуум следует поддерживать еще в течение нескольких секунд, чтобы удалить оставшиеся капли жидкости. Объем фильтруемой жидкости зависит от содержания микробов, но он должен составлять по меньшей мере 20 мл, чтобы быть уверенным в равномерном распределении микроорганизмов на мембране и избежать значительной их потери на стенках воронки. Если из-за высокого содержания микроорганизмов нужно отфильтровать меньший объем пробы, то, прежде чем внести пробу в фильтровальную воронку, в воронку следует добавить около 20 мл соответствующего стерильного растворителя. В некоторых случаях после фильтрации пробы может потребоваться промывка мембраны небольшим количеством стерильной воды. По завершении фильтрации фильтровальную воронку отсоединяют, а мембрану немедленно удаляют

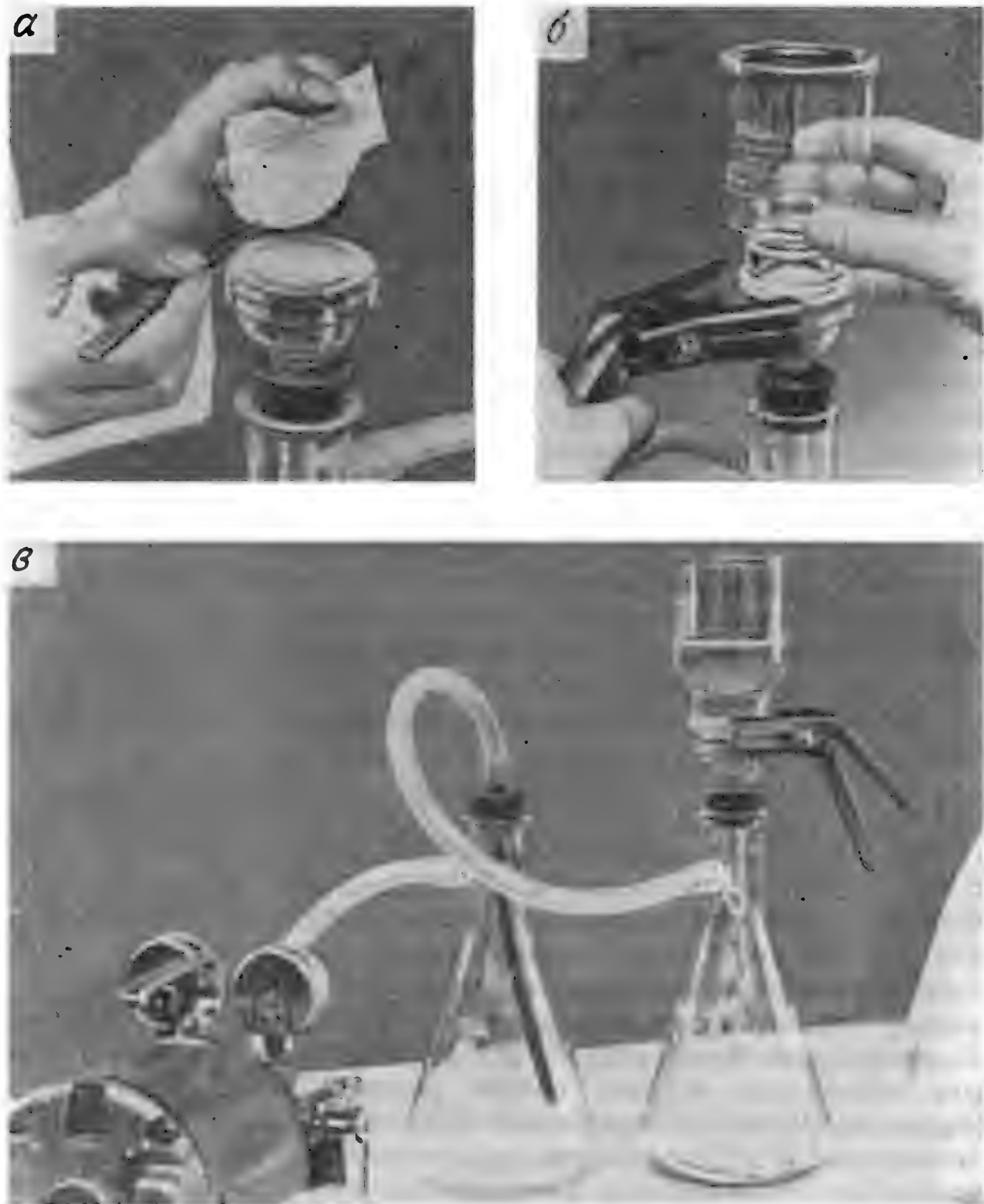


Рис. 9.1. Последовательность выполнения процедуры по подсчету микроорганизмов в водной пробе с помощью мембранного фильтра. а — мембрану вынимают из стерильного пакета и помещают на стерильное основание фильтродержателя; б — фильтровальная воронка прикрепляется к основанию специальным зажимом так, чтобы не загрязнить и не помять мембрану; в — водная проба пропускается через мембрану под вакуумом. (Фото любезно предоставлены фирмой «Миллипор».)

стерильным пинцетом и помещают на стерильную пористую подложку, содержащую питательную среду, или в чашку с соответствующей культуральной средой на агаре (рис. 9.2, *а*). Помещая мембрану на подложку или агар, ее следует слегка покачивать, чтобы удалить с поверхности мембраны пузырьки воздуха.

При проведении рутинных анализов воды в тех случаях, когда содержание микробов невелико и практически не меняется от пробы к пробе, для большой серии проб можно пользоваться одним и тем же фильтродержателем, но между каждой пробой фильтровальную воронку необходимо промывать 20—30 миллилитрами стерильной воды. При работе же с неизвестными пробами, а также с пробами, сильно отличающимися друг от друга содержанием микроорганизмов, для каждой пробы должен использоваться свежестерилизованный фильтродержатель. Быструю повторную стерилизацию можно осуществить с помощью ультрафиолетового стерилизатора (достаточно двух минут обработки), текучим паром, кипячением или промывкой метанолом или этанолом с последующим их воспламенением.

Необходимо проследить, чтобы при инкубации края крышек у чашек Петри были обращены вниз. Для предотвращения испарения культуральной среды рекомендуется во время инку-

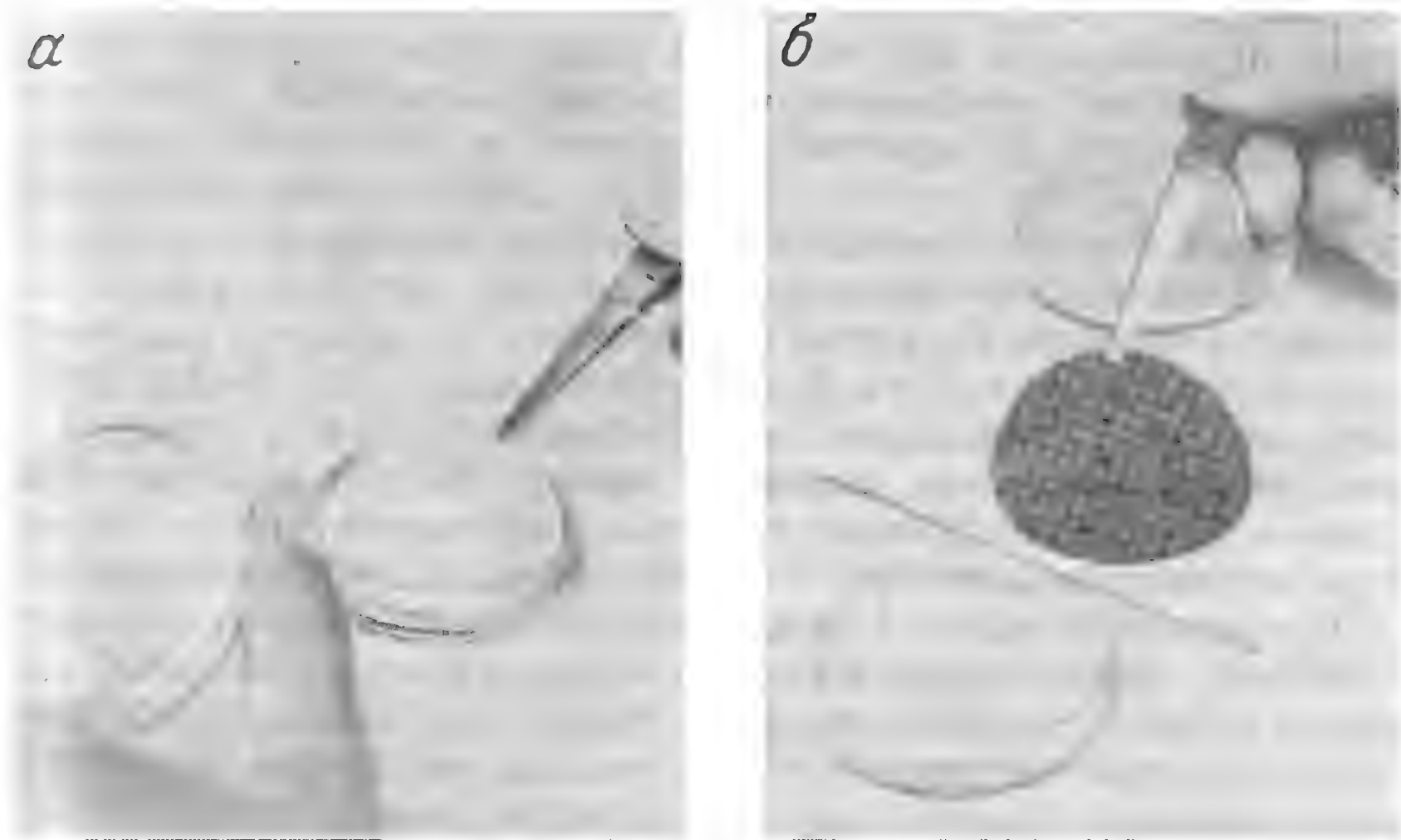


Рис. 9.2. *а* — помещение мембраны в чашку Петри на поверхность агара для инкубации; *б* — колонии, выросшие после инкубации. (Фото любезно предоставлены фирмой «Миллипор».)

бации помещать чашки в пластиковые мешки. Особое внимание должно быть уделено тому, чтобы температура термостата была достаточной и повсюду одинаковой. Для полевых работ в отдаленных местах фирма «Миллипор» выпускает портативный термостат, в котором можно инкубировать несколько дюжин чашек.

После соответствующей инкубации колонии, выросшие на мембране (рис. 9.2, б), подсчитывают с помощью подходящего метода. В большинстве случаев эти колонии можно подсчитать невооруженным глазом, но лупа с небольшим увеличением не будет лишней. Некоторые используют стереомикроскоп, однако это имеет смысл лишь в случае очень небольших колоний. Счет можно облегчить, регулируя подсветку, а контрастность может быть изменена применением черных мембран или красителей, которые включаются в колонии во время их роста. Необходимо быть уверенным в том, что такие красители не тормозят рост подсчитываемых микроорганизмов. Если для особой цели используют дифференциальную среду, подсчитываются только те колонии, которые обладают характерной окраской или блеском.

Увеличение контрастности. Если нужно увеличить контрастность, то мембранный фильтр, содержащий колонии, может быть окрашен перед счетом соответствующим красителем. Малвэни [155] описывает два способа окраски: один, когда окрашивают мембрану, чтобы сделать ее контрастной по отношению к колониям, и другой, когда окрашивают колонии, чтобы сделать их контрастными по отношению к мембране. Для окрашивания мембраны используют оксалат малахитового зеленого в виде 0,01 %-ного водного раствора. Поверхность мембраны, находящейся еще в инкубационной чашке, осторожно заливают 2—4 миллилитрами раствора красителя, который через 8—10 секунд сливают. При этом способе окраски колонии выглядят белыми или желтыми на фоне зеленой мембраны. Чтобы окрасить колонии, используют метиленовый голубой: раствор 3 г метиленового голубого, растворенного в 300 мл этанола, смешивают с 1 л 0,01 %-ного раствора гидроокиси калия. Около 2 мл этого красящего раствора используют для пропитки абсорбирующей бумажной подложки, после чего на нее кладут мембрану, содержащую колонии. Через 15 минут колонии выглядят темно-голубыми на фоне более слабоокрашенной мембраны. Любой из этих способов может оказаться полезным, когда колонии, подлежащие счету, очень малы.

Интерпретация результатов и возможные трудности. Число колоний, которое должно быть подсчитано для получения статистически достоверных результатов, различно для методов, использующих мембранные фильтры, и для традиционных мето-

дов, использующих разлив испытуемой пробы на чашках. При чашечном методе рекомендуется 30—300 колоний на чашку, в то время как при использовании мембранных фильтров из-за меньшей площади поверхности, на которой растут колонии, рекомендуется 20—80 колоний на мембрану [3]. Некоторые вопросы статистики подсчета обсуждаются в разд. 10.4 (см., в частности, табл. 10.3).

В результате неправильного обращения с мембранными фильтрами могут возникнуть следующие трудности:

1. Если все колонии сосредоточились в одной части мембраны, то это, как правило, указывает на неверное распределение анализируемой жидкости по поверхности мембраны и обычно наблюдается при работе с пробами малого объема (рис. 9.3, а).

2. Если число колоний превышает рекомендуемый для мембранных фильтров диапазон 20—80 (рис. 9.3, б), то следует фильтровать пробу меньшего объема. Подсчет также недостоверен, если присутствующие в пробе волокна или другие макроскопические частицы вызывают слияние колоний (рис. 9.3, в).

3. Если используется дифференциальная среда, то при этом возникает проблема, связанная с высоким фоновым счетом, благодаря тем микроорганизмам, которые, хотя и не дают характерной для колоний бактерий окраски, растут на этой среде. Конкуренция с этими сопутствующими микроорганизмами приводит, как правило, к недостоверности результатов подсчета. Единственная возможность получить при этом надежные результаты — разделить пробу на несколько проб меньшего объема и каждую из них пропустить через отдельный мембранный фильтр.

4. Если мембрана не была правильно установлена над питательной средой, то под мембраной может образоваться сухое пятно, а на ее поверхности пятно, не содержащее колоний (рис. 9.3, г), что также приводит к ошибочному подсчету.

5. Если около края мембраны развивается большое число колоний (рис. 9.3, д), то это указывает на то, что фильтродержатель либо был неправильно установлен, либо был плохо очищен и стерилизован. Результаты подсчета, полученные в таких условиях, недостоверны и должны быть отброшены.

6. Мутные пробы представляют особую проблему. Мутность обычно вызывается осадком или водорослями. После фильтрования мутных образцов цвет мембранного фильтра становится темно-желтым, желтовато-коричневым или зеленовато-желтым. Частицы, осевшие на мембране, зачастую тормозят бактериальный рост, или же цвет частиц затрудняет распознавание колоний, подлежащих подсчету. Самое лучшее средство для борьбы с мутностью разделить пробу на несколько отдель-

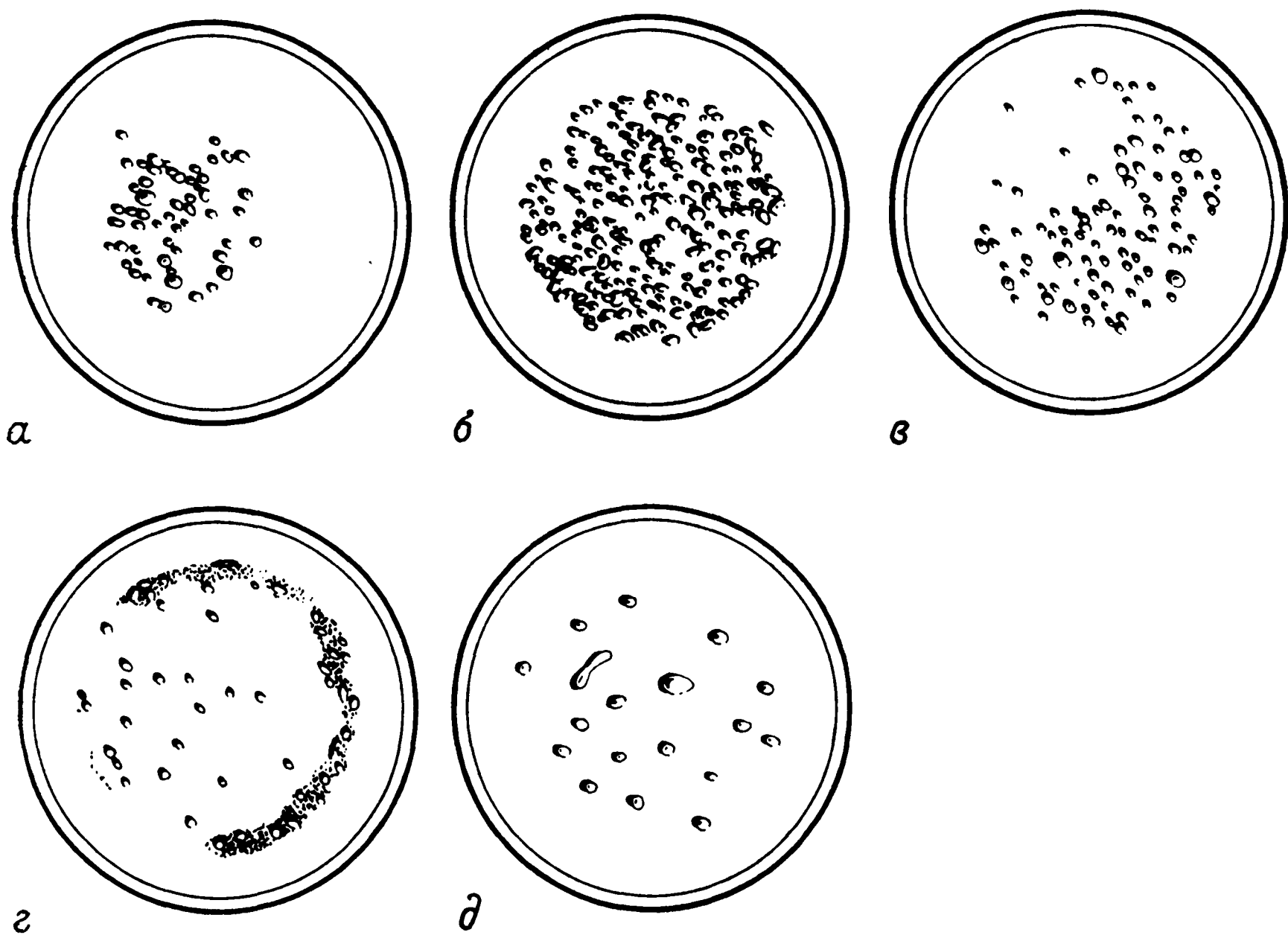


Рис. 9.3. Случаи, когда возможен неверный подсчет при работе с мембранными фильтрами. а — неравномерное распределение колоний, обусловленное, по-видимому, нанесением небольшой пробы из пипетки прямо на сухую мембрану (*рекомендация*: прежде чем проводить фильтрацию, пробу следует разбавить стерильной водой); б — число колоний слишком велико (*рекомендация*: прежде чем проводить фильтрацию, пробу следует разбавить стерильной водой и фильтровать лишь часть пробы); в — неравномерное распределение колоний, вызванное сухим пятном, на котором микроорганизмы не росли (*рекомендация*: необходимо убедиться в том, что мембранный фильтр положен на питательную среду правильно); г — большое число слипшихся колоний у края мембраны, обусловленное неправильным ее закреплением в фильтродержателе или тем, что фильтродержатель не был как следует очищен или стерилизован (*рекомендация*: надо хорошо промыть и простерилизовать фильтродержатель; необходимо убедиться в том, что мембрана правильно закреплена под фильтровальной воронкой); д — наличие волокон в пробе приводит к разбрасыванию колоний и, возможно, к слиянию некоторых из них (*рекомендация*: необходимо удалить волокна, для чего пробу следует предварительно профильтровать через фильтровальную бумагу).

ных проб (от двух до пяти), а потом сложить подсчитанные на этих мембранах числа для конечного результата. Если, для того чтобы исключить проблему мутности, требуется более 5 проб, то мембранные фильтры лучше не использовать, а обратиться к методу «многих пробирок».

7. Даже если была отфильтрована проба правильного объема, из-за оставшейся на мембране воды, которая вызывает

распространение колоний, может произойти слияние растущих колоний. Чтобы избежать этого, перед отсоединением вакуума необходимо убедиться в том, что из мембраны отжата вся вода. При перенесении на питательную среду мембраны не должны быть сырыми, влажными или вяло свисающими.

Мембраны, содержащие колонии, могут быть высушены и храниться в течение многих лет в качестве контрольных образцов. Для этого мембрану берут из чашки и кладут на кусок сухого картона. После такого высушивания ее можно положить в целлофановый конверт, который помещается в рабочий журнал. Хотя эта мембрана, очевидно, не то же самое, что свежая, хранение контрольных образцов может оказаться полезным в целях повторного контроля.

9.4. ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ПОДСЧЕТА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мембранные фильтры адсорбируют некоторые компоненты питательной среды, так что действительные их концентрации, с которыми имеют дело микроорганизмы на мембране, могут отличаться от концентрации этих компонентов в жидких средах или на поверхности агара. Еще в начале применения мембранной фильтрации было показано [123], что для получения наилучших результатов большинство сред нуждается в некотором изменении. Большой проблемой является адсорбция компонентов среды мембраной, особенно для ингибиторов, которые вводят в состав многих питательных сред для того, чтобы сделать их селективными [63]. Поэтому были разработаны специальные питательные среды, предназначенные для работы с мембранными фильтрами. Эти среды обычно обозначаются фирмой-изготовителем добавлением буквы «М» перед наименованием продукта. Американская ассоциация здравоохранения [3] дает точные составы М-сред, применяемых при анализе воды; эти среды поставляются на рынок целым рядом фирм. Некоторые селективные питательные среды (например, эозин-метилен голубой¹), широко применяемые при проведении анализов воды, не работают с мембранными фильтрами. Для сравнения в табл. 9.1 приведены составы питательных сред Эндо и М-Эндо. Питательную среду в зависимости от того, как должна быть проведена инкубация, можно приготовить либо в виде бульона, либо с агаром. В лабораториях, где проводится большое число анализов, обычно используют пористые подложки из бумаги, насыщенные жидкой питательной средой, но нередко выделение микроорганизмов оказывается лучше,

¹ Англ. сокращение ЕМВ.— *Прим. ред.*

когда инкубацию проводят на поверхности агара. Даубнер и Петер [57] для увеличения скорости диффузии компонентов питательной среды рекомендуют снизить концентрацию агара с 1,5 %, используемых в обычных чашечных средах, до 1,0 %. Следует заметить, что тщательно проведенный анализ дает одинаковое выделение микроорганизмов при инкубации как на целлюлозных бумажных подложках, так и на агаре.

Таблица 9.1. Сравнение питательных сред Эндо и М-Эндо по составу входящих в них компонентов

Компонент	Эндо	М-Эндо
Дрожжевой экстракт	1,2	1,5
Триптоза	7,5	10,0
Казитон или триптиказа	3,7	5,0
Тиопептон или тиотон	3,7	5,0
Лактоза	9,4	12,5
K ₂ HPO ₄	3,3	4,375
KH ₂ PO ₄	1,0	1,375
NaCl	3,7	5,0
Дезоксихолат натрия	0,1	1,0
Лаурилсульфат натрия	0,05	0,05
Сульфит натрия	1,6	2,1
Фуксин основной	0,8	1,05

Приводимые здесь значения представляют собой содержание сухого компонента в граммах на литр дистиллированной воды. Следует заметить, что для большинства компонентов концентрация для культивирования на мембранных фильтрах должна быть выше той, которая необходима для культивирования на агаре.

9.5. СРАВНЕНИЕ МЕТОДА МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ С ЧАШЕЧНЫМ МЕТОДОМ

При подсчете микроорганизмов с помощью мембранных фильтров в зависимости от различных условий роста для данной разновидности микробов могут быть получены либо более низкие, либо более высокие, либо те же результаты, что и при подсчете с использованием чашечного метода с агаром. Даубнер и Петер [57] в обстоятельном обзоре замечают, что число микроорганизмов, подсчитанных на мембранах, больше, чем на чашках. Однако Браун [40] показал, что для чистых культур *E. coli* метод мембранных фильтров дает постоянно более низкие значения, чем стандартный чашечный метод, и что результаты подсчетов зависят от штамма (табл. 9.2). В этих опытах мембранные фильтры не были токсичными, но затруд-

Таблица 9.2. Сравнение результатов подсчета числа жизнеспособных микроорганизмов при использовании чашечных методов и метода мембранных фильтров для нескольких штаммов *E. coli* (согласно данным Брауна [40])

Штамм	Число опы-тов	Метод равномерно-го посева	Метод розлива	Мембранный фильтр	K^*	Значимость**
F-26	12	$2,37 \pm 0,25$		$1,78 \pm 0,14$	$0,75 \pm 0,08$	$<0,01$
B	11	$3,90 \pm 0,35$	$2,44 \pm 0,55$	$0,60 \pm 0,62$	$0,20 \pm 0,21$	$<0,01$
B _s -1	9	$3,05 \pm 0,35$	$2,96 \pm 2,85$	$1,31 \pm 1,51$	$0,49 \pm 0,33$	0,0118
B/г	12	$2,96 \pm 0,74$	$1,80 \pm 0,91$	$1,28 \pm 1,38$	$0,55 \pm 0,44$	0,0210
G4	11		$10,78 \pm 3,35$	$9,00 \pm 2,75$	$0,85 \pm 0,17$	0,0244

В третьей, четвертой и пятой колонках приведены средние значения и стандартные отклонения, полученные при подсчетах микроорганизмов на культурах, находящихся в стадии экспоненциального роста. Умножая эти значения на 10^8 , мы получаем число жизнеспособных микроорганизмов на миллилитр культуры. В каждом опыте использовались шесть чашек и шесть мембранных фильтров.

* В шестой колонке величина K есть отношение среднего числа колоний, подсчитанных на мембране, к среднему числу подсчетов на чашках.

** Значимость определялась с помощью теста, предложенного Уилкоксоном.

ненная диффузия питательных веществ к поверхности мембраны, очевидно, задерживала рост, поскольку обращенная инкубация мембран, при которой микроорганизмы находились в непосредственном контакте с источником питательных веществ¹, дала колонии, эквивалентные контрольным. Янг [241] сравнил метод мембранных фильтров с различными чашечными методами (равномерного посева, розлива и точечным) при подсчете бактерий в пробах воды и отстоя и показал, что метод мембранных фильтров в этих случаях дает более низкие значения, чем все другие методы (табл. 9.3). Ясно, что ценность метода должна зависеть от типа исследуемых микроорганиз-

Таблица 9.3. Сравнение гетеротропных бактериальных концентраций, определенных несколькими чашечными методами [241]*

Тип пробы	Число проб	Розлив на чашках	Равномерный посев на чашках	Мембранный фильтр
Вода	84	4,32 (2,85—6,46)	4,84 (3,48—6,70)	4,62 (3,60—6,23)
Отстой	32	7,02 (5,90—8,26)	7,26 (6,16—8,03)	6,99 (5,72—7,89)

* В третьей, четвертой и пятой колонках приведены десятичные логарифмы средне-геометрического значения бактериальной концентрации на миллилитр раствора.

¹ При обращенной инкубации к питательной среде обращена та сторона мембраны, на которой находятся уловленные микроорганизмы.—Прим. ред.

мов, среды и применяемых условий культивирования. В большинстве случаев метод мембранных фильтров используют, когда плотность популяции микроорганизмов мала; при этом чашечные методы непригодны, так что какие-либо сравнения проводить затруднительно. Очевидно, при высоких концентрациях клеток чашечные методы много более удобны в работе, чем метод мембранных фильтров, и их следует считать более предпочтительными.

Поврежденные или подвергнутые стрессу микроорганизмы могут давать на мембранных фильтрах другие результаты подсчета, чем те, которые получаются на чашках с агаром. К стрессовым воздействиям на клетки относятся высокая температура, радиация и действие химических соединений, вызывающих сублетальные повреждения клетки. Результаты подсчета поврежденных клеток могут зависеть от используемых условий их культивирования и, видимо, оказываются менее верными при работе с мембранными фильтрами, чем с агаром или жидкими средами, особенно в тех случаях, когда к средам добавляют ингибиторы, чтобы создать избирательность по отношению к некоторым разновидностям микробов. Согласно Хоудли [105], «популяции поврежденных, но выживших клеток, неспособных формировать колонии, ... могут многократно превысить популяцию неповрежденных клеток, особенно в некоторых питьевых водах и хлорированных стоках». Поскольку некоторые из этих выживших, но поврежденных бактерий могут быть патогенными, нельзя допустить, чтобы они не были обнаружены методом мембранных фильтров. Единственный приемлемый способ количественного определения поврежденных микроорганизмов состоит в использовании предварительного обогащения, при котором мембрана, содержащая микроорганизмы, преинкубируется в неселективной среде в течение нескольких часов, чтобы до перенесения мембраны в селективную питательную среду микроорганизмы могли восстановиться. Подробное описание методов, которые использовались для различных видов микроорганизмов, можно найти в работе [105].

9.6. ПОДСЧЕТ НЕКОТОРЫХ ОСОБЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

В большом числе исследований в различных областях микробиологии мембранную фильтрацию приспособили для подсчета или избирательного культивирования особых физиологических групп микроорганизмов. Даубнер и Петер [57], а также Дутка [64] выполнили обзоры, куда включили многие из этих исследований. Бактериологический анализ воды представляет собой по существу метод подсчета особой группы микроорга-

низмов (БГКП), которая рассматривается как индикатор загрязнения воды.

Единственная общая методика для подсчета определенной группы микроорганизмов заключается в проведении диагностического теста на образовавшиеся колонии. Шиманн [182] рассмотрел идею **последовательного переноса**, согласно которой мембрану, содержащую колонии, переносят во вторую среду или реагент для проведения диагностического теста, который обнаружит колонии конкретного вида. Например, бактерии семейства *Pseudomonadaceae* можно отличить от ряда других групп грам-отрицательных бактерий с помощью оксидазного теста, на который псевдомонады дают положительную реакцию. Даубнер и Петер [57] показали, что для колоний, выросших на мембранных фильтрах, можно провести оксидазный тест, если поместить мембрану, содержащую полностью проросшие колонии, на фильтровальную бумагу, насыщенную оксидазным реагентом. Колонии, дающие при этом положительную реакцию, становятся окрашенными в голубой цвет, что и проявляется в течение 1—2 минут.

На колониях, выросших на мембранных фильтрах, можно провести и другие диагностические тесты такого рода. Например, желатиназная активность может быть обнаружена переносом мембран, содержащих колонии, в чашки с желатиновой средой с последующей инкубацией в течение 1—2 часов, удалением мембран и промывкой чашек раствором хлорной ртути, чтобы осадить негидролизированный желатин. Прозрачные области указывают, какие именно колонии способны гидролизовать желатин [29]. Бактерии *Clostridium perfringens* могут быть обнаружены по типичной реакции на яичный желток, если предварительно провести инкубацию в чашках, содержащих яичный желток, а затем удалить мембрану и проверить область под колониями, чтобы убедиться в том, что произошла преципитация яичного желтка.

Для серологической характеристики, чтобы проверить микроколонии прямо на мембранах, можно использовать препараты флюоресцирующих антител [31]. После того как колонии проросли, они фиксируются формальдегидом, обрабатываются препаратом флюоресцирующих антител и проверяются на флюоресцентном микроскопе. Уже после нескольких часов инкубации образуются столь большие микроколонии, что их можно обнаружить с помощью флюоресценции. Этот метод позволяет проверить также полностью развившиеся колонии с помощью микроскопа для препарировальных работ с соответствующими источниками света и светофильтрами.

Были описаны и другие методы, использующие мембранные фильтры для подсчета определенных групп бактерий: несер-

ных пурпурных бактерий [213]; *Clostridium perfringens* [29]; *Pseudomonas aeruginosa* [137, 45]; энтерококков, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Leptospira* [57]; *Vibrio fetus* [195]; *Mycobacterium tuberculosis* [179]; *M. leprae* [180]; сульфат-восстанавливающих бактерий [225]. Куницка-Голдфингер и Стронковска [131] описали метод полунепрерывного культивирования нативной водной бактерии на мембранных фильтрах. Даусон и Джонс [58] рассмотрели использование мембранных фильтров для изучения развития плодовых тел *Muxococcus xanthus*.

Велдкамп [231] рассмотрел применение мембранной фильтрации для отделения небольших спирилл, спирохет и *Bdellovibrio* от обычных бактерий. Используемые при этом мембраны имеют размер пор 0,45 мкм. В случае спирилл стерильный мембранный фильтр кладут на подходящую питательную среду с агаром (лучше с относительно мягким агаром), а на верхнюю сторону мембраны помещают небольшую каплю инокулята. В процессе инкубации крошечные подвижные бактерии проходят через мембрану и растут на агаре внизу, распространяясь тонким слоем по чашке, откуда они могут быть выделены штриховой разводкой. В случае спирохет и *Bdellovibrio* смесь пропускают через мембрану, а фильтрат используют затем для посева на соответствующей обогащенной среде. Эту последнюю методику Белли и др. [24] использовали также для выделения *Thermoplasma acidophilum* из угольных отвалов. Мембранные фильтры применяются также для выделения спирохет рода *Leptospira* (см. обсуждение этого вопроса в разд. 10.9).

Гэбридж [79], Клайв и Лэндман [48], а также Вайрик и Гудер [240] рассмотрели выращивание микоплазм и L-форм бактерий (в обоих типах микроорганизмов отсутствуют клеточные стенки) на мембранных фильтрах. Кроме того, чтобы отделить микоплазмы или L-формы от обычных бактерий, препарат может быть пропущен через мембрану с размерами пор 0,45—0,65 мкм [148]. Благодаря своей пластичности исключительно гибкие микоплазмы и L-формы часто проходят через такие мембраны и могут выращиваться переносом фильтрата в бульон.

При проведении работ по подсчету микроорганизмов из неводных материалов, таких, как масло или фармацевтические продукты на его основе, оставшееся в мембране масло делает ее гидрофобной и в дальнейшем затрудняет ее смачивание питательной средой. Чтобы вымыть оставшееся масло, мембрану необходимо промыть по меньшей мере 100 мл стерильного 0,1 %-ного раствора Тритона X-100, неионного детергента, а затем 20—30 мл стерильного бульона или буфера. Джиллис и др.

[88] для подсчета микроорганизмов, суспендированных в неводных материалах типа нефтяных масел, использовали специальные мембраны из желатины производства фирмы «Сарториус» [88]. Эти мембраны с размером пор 3 мкм обладают уникальной способностью растворяться в воде. После того как препарат прошел через мембрану, последнюю можно растворить в питательной среде и провести подсчет микроорганизмов чашечным методом на агаре. Преимущество такого метода состоит в том, что можно использовать очень высокую улавливающую способность мембранного фильтра, так что отпадает необходимость в выращивании микроорганизмов на поверхности мембраны. Конечно, это годится только для работы с неводными материалами. (Эти мембранные фильтры можно также использовать для анализа проб воздуха; см. гл. 14.)

Мембранная фильтрация применялась для подсчета микроорганизмов в медицинских анализах крови, мочи, мокроты и спинномозговой жидкости [234]. При анализе крови вначале необходимо с помощью гемолиза [155] или центрифугирования при малых скоростях (подробнее этот вопрос рассматривается в работе [237]) избавиться от эритроцитов и лейкоцитов. Мокроту нужно сначала обработать, чтобы удалить мукопротеины, которые приводят к забиванию мембранного фильтра. Для подсчета *Mycobacterium tuberculosis* в мокроте [155] обычный клинический метод состоит в обработке мокроты раствором 5 г N-ацетилцистеина в 1 л 4 %-ного карбоната натрия (*M. tuberculosis* необычайно устойчивы к щелочам, так что условия такой обработки не влияют на их жизнеспособность). К 10 мл мокроты добавляют 30 мл указанного раствора и оставляют при комнатной температуре на 15—30 минут, после чего добавляют 10 мл стерильного 1 %-ного раствора тритона X-100 и фильтруют через мембрану с размером пор 0,45 мкм. Тритон X-100 можно использовать также для улучшения фильтруемости мочи. Спинномозговую жидкость можно, как правило, фильтровать без предварительной обработки, но во избежание свертывания фильтрацию необходимо проводить сразу после ее взятия.

9.7. МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ С ГИДРОФОБНОЙ СЕТКОЙ

Шарп и его сотрудники опубликовали ряд статей, описывающих производство и применение специальных мембранных фильтров для подсчета микроорганизмов в таких объектах, как пищевые продукты и пищевые суспензии, в которых содержание микробов весьма велико. В эти мембраны впечатана гидрофобная сетка, предназначенная для лучшего роста

колоний на переполненных микробами мембранах. Цель гидрофобной сетки — создать на поверхности мембраны множество небольших участков, для того чтобы подавить боковое распространение колоний [188]. Каждый квадрат сетки становится по сути отдельной культуральной камерой, и можно вырастить примерно в 100 раз большее количество колоний, чем с обычными мембранными фильтрами.

На обычных мембранных фильтрах расположение колоний на поверхности беспорядочно, в то время как на мембранном фильтре с гидрофобной сеткой положение и размеры колоний предопределены структурой сетки (рис. 9.4). Согласно Шарпу и Мишо [190], метод подсчета, в котором используется мембранный фильтр с гидрофобной сеткой, можно рассматривать по аналогии с многопробирочным методом НВЧ; каждый квадрат сетки может либо содержать, либо не содержать колонию. Подсчет по методу НВЧ связан с подсчетом положительных сеток на мембранном фильтре с гидрофобной сеткой, содержащей N клеток, следующим соотношением:

$$\text{НВЧ} = -N \cdot \ln [(N - x)/N];$$

здесь x — число клеток, содержащих колонии.

Главное преимущество мембранных фильтров с гидрофобной сеткой заключается в том, что подсчет жизнеспособных микроорганизмов, содержащихся в неизвестных материалах, может быть выполнен без проведения разбавлений с целью понизить число колоний до уровня, который допускает применение нормальных мембранных фильтров для подсчета. Максимальное число пригодных для подсчета колоний на таких мембранных фильтрах достигает 30 000, что делает возможным анализ материалов как с высокой, так и с низкой плотностью без разбавления. Будет ли это иметь значительное преимущество в реальной ситуации, зависит от целого ряда факторов. Приведены достаточно сильные доводы, подтверждающие ценность таких сетчатых мембран в пищевой микробиологии [192], а в работе [189] рассмотрены их преимущества для автоматизации микробиологических операций.

Нанесение на мембранный фильтр сетки может быть осуществлено либо вручную [189], либо с помощью машины [190]. Мембранные фильтры с гидрофобной сеткой выпускаются также канадской фирмой «QA Лэборэтриз лимитед» (адрес этой фирмы: 135 The West Mall, Unit 2, Etobicoke, Ontario, Canada M9C 1C2). Однако мембраны с гидрофобной сеткой стоят довольно дорого; цена пакета, содержащего 100 мембран с гидрофобной сеткой и размером пор 0,45 мкм, примерно в два раз выше цены такого же пакета с обычными мембранами.

Шарп и Мишо [189] наносили вручную гидрофобную сетку на мембраны типа НА из смешанных эфиров целлюлозы с размером пор 0,45 мкм, производимые фирмой «Миллипор». Операция проводилась следующим образом. На тщательно изготовленную из цинка печатную форму с помощью валика наносился расплавленный парафиновый воск. Мембрану, покры-

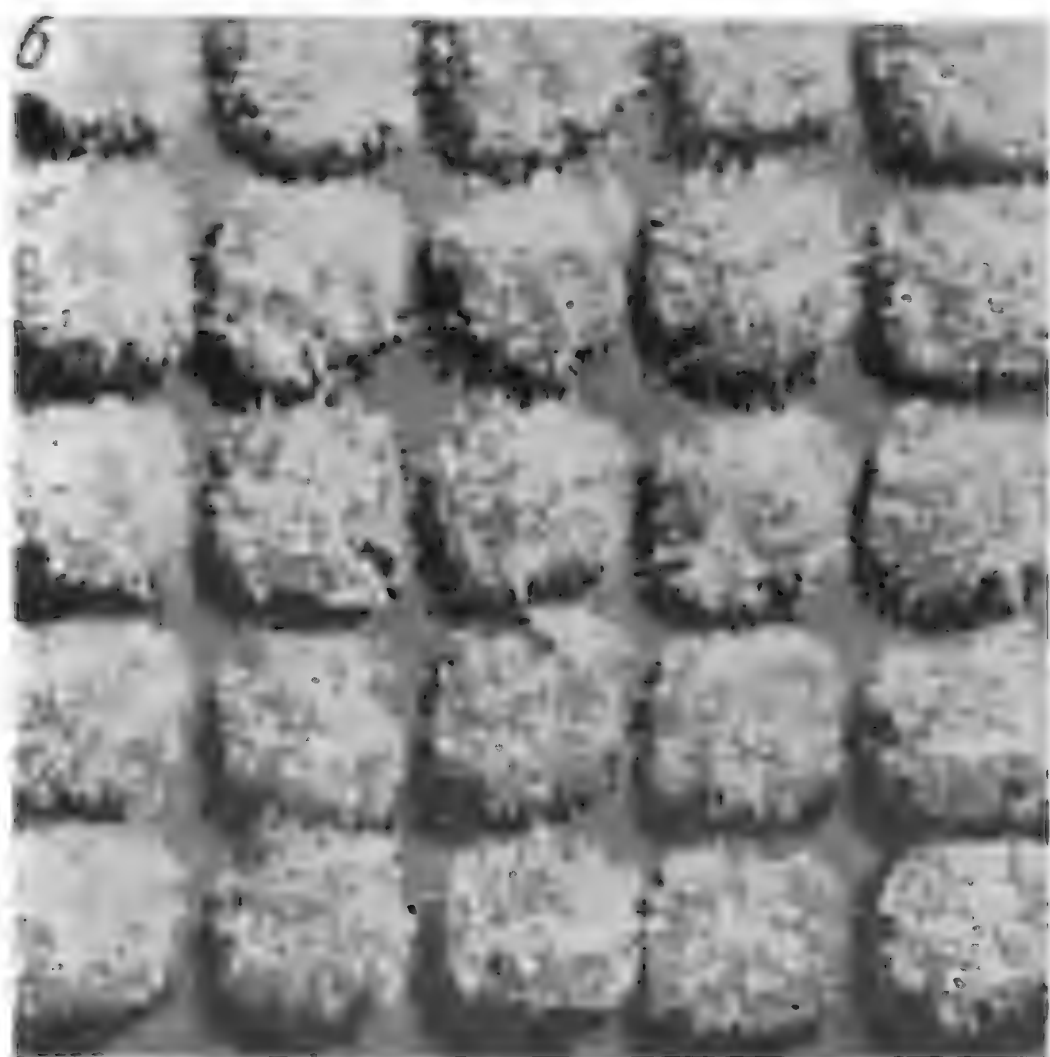
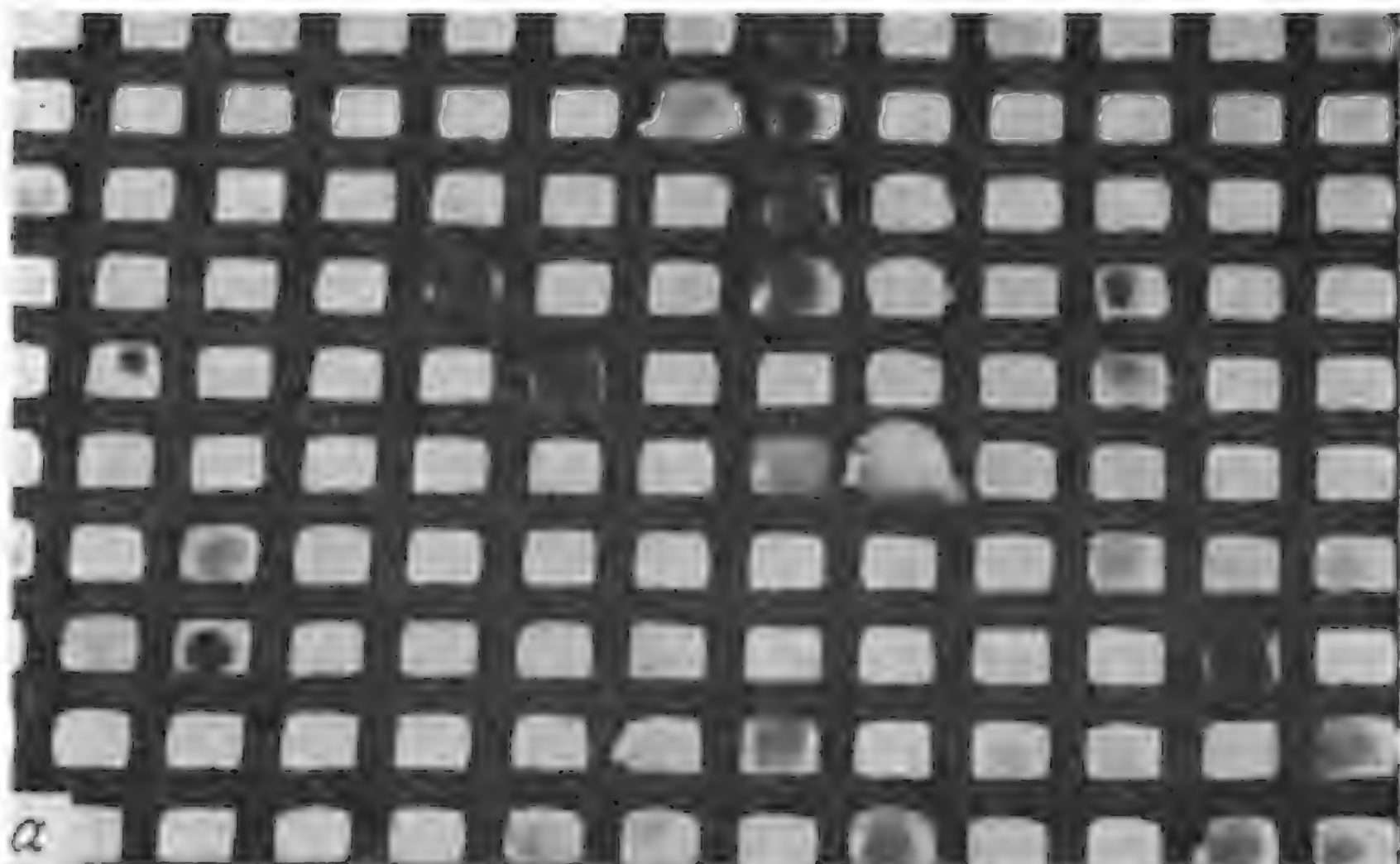


Рис. 9.4. Колонии, выросшие на мембранном фильтре с гидрофобной сеткой. *a* — колонии бактерий; *б* — колонии плесневых грибов. (Фото Филлис Энтис, Q. A. Labs.)

тую защитной пергаментной бумагой в виде диска, клали на поверхность этой формы и, осторожно проводя по ней чистым резиновым валиком, переводили воск на мембрану. Для того чтобы цинковая форма оставалась теплой, между операциями ее помещали на нагретую плиту. Для перенесения мембран во избежание загрязнений использовался стерильный пинцет. Цинковые формы имели примерно 20 линий на 1 см, что давало 3650 сеточных квадратов на фильтрующую поверхность диаметром 3,49 см. Ширина линии составляла 0,2 мм [192] и примерно 666 мм², т. е. 65 % всей поверхности сетки было доступно для фильтрации. Из-за блокирования пор нанесенной сеткой производительность таких мембран несколько меньше по сравнению с обычными, но для большинства случаев это, по-видимому, малосущественное обстоятельство. В случае машинного нанесения сеток на мембраны линии сетки komponуются из специальных марок цемента (Ash model cement, Amalgamated Dental Trade Distributors Ltd., London, England), используемых обычно для изготовления зубных протезов; с этим материалом легко обращаться, и он характеризуется высокой гидрофобностью.

Мембраны с нанесенной сеткой нельзя подвергать тепловой стерилизации (сеточные линии при этом размываются), но их можно стерилизовать с помощью окиси этилена или ультрафиолетового облучения. Шарп указывает, однако, что определенные предосторожности при нанесении сеточных линий на предварительно стерилизованные мембранные фильтры позволяют сохранить их стерильность.

Мембраны с гидрофобной сеткой представляют собой новую интересную разработку в технологии мембранной фильтрации. Найдут ли эти мембраны широкое применение, будет зависеть от того, будут ли они приняты законодательными учреждениями, которые предписывают стандартные методики мембранной фильтрации для проверки качества пищевых продуктов и воды.

9.8. СПЕЦИАЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА ДЛЯ ПОЛЕВЫХ РАБОТ

Рассмотренные в разд. 9.3 основные методы подсчета жизнеспособных микроорганизмов в водных пробах предназначены главным образом для лабораторных исследований. Для полевых же работ, где время, пространство и оборудование лимитированы, были разработаны некоторые специальные удобные в работе устройства, позволяющие проводить подсчеты микроорганизмов в водных пробах.

Пробоотборник фирмы «Миллипор». Этот пробоотборник Millipore Sampler представляет собой простое устройство для быстрой проверки бактериального загрязнения воды [53]. Он состоит (рис. 9.5) из пластиковой основы, поддерживающей мембрану с размером пор 0,45 мкм, изготовленную из смешанных эфиров целлюлозы; к мембране крепится пористая подложка, содержащая обезвоженную культуральную среду. Пробоотборник в стерилизованном виде хранится в пластмассовой коробке для транспортировки до взятия пробы. Когда его погружают в водную пробу (рис. 9.6, а), пористая подложка впитывает через мембрану 1 мл жидкости и микроорганизмы водной пробы задерживаются мембраной. Культуральная среда при этом увлажняется водой и, диффундируя через мембрану, поставляет питательные вещества для роста задержанных бактерий. Пробоотборник инкубируют при соответствующей температуре, а выросшие при этом колонии (рис. 9.6, б) затем подсчитывают (на мембране имеется сетка для облегчения счета). Следует заметить, что в этой модификации мембранного метода подсчета ингибиторы, находящиеся в воде, не удаляются, как это имело бы место в случае обычной мембранной фильтрации [82].

Пробоотборники продаются с несколькими различными обезвоженными средами. Одна из этих сред является неселективной и используется при подсчете общего бактериального заражения (SPC Sampler), вторая позволяет подсчитывать БГКП и ФКП (Coli-Count Sampler для подсчета в зависимости от температуры инкубации либо БГКП, либо ФКП), третья среда используется для подсчета дрожжевых и плесневых грибов,

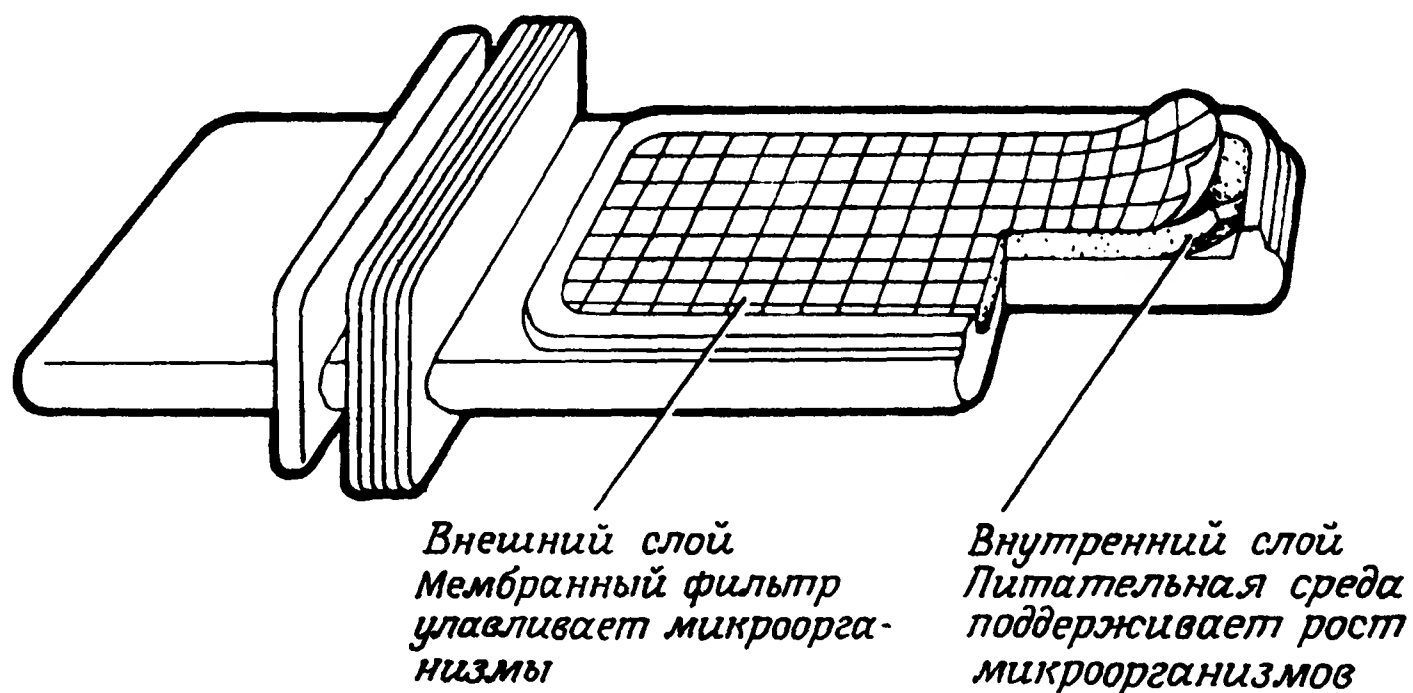


Рис. 9.5. Схематическое изображение пробоотборника фирмы «Миллипор». Пористая подложка содержит обезвоженную питательную среду. Когда прибор погружают в водную пробу, 1 мл жидкости под действием капиллярных сил затягивается через мембрану; при этом происходит фильтрация пробы и смачивание питательной среды.

а четвертая для подсчета *Pseudomonas*. Фирма «Миллипор» выпускает также компактный термостат, который можно использовать для инкубации с этими пробоотборниками.

Коттон и др. [53] провели испытания с целью сравнить результаты подсчета, получаемые с этим пробоотборником, и с помощью стандартных методов как при определении общего бактериального загрязнения, так и при подсчете БГКП и ФКП. Оказалось, что в обоих случаях результаты практически совпадали. ASTM рекомендует применение пробоотборника фирмы «Миллипор» в качестве стандартного метода для определения общего бактериального загрязнения воды (Стандарт F 488). Возможности рассматриваемого пробоотборника, очевидно, ограничены теми пробами, объем которых не превышает 1 мл. ASTM предлагает использовать его для обнаружения источника бактериального загрязнения в различных системах или для проверки компонентов системы водоочистки, таких, как колонки

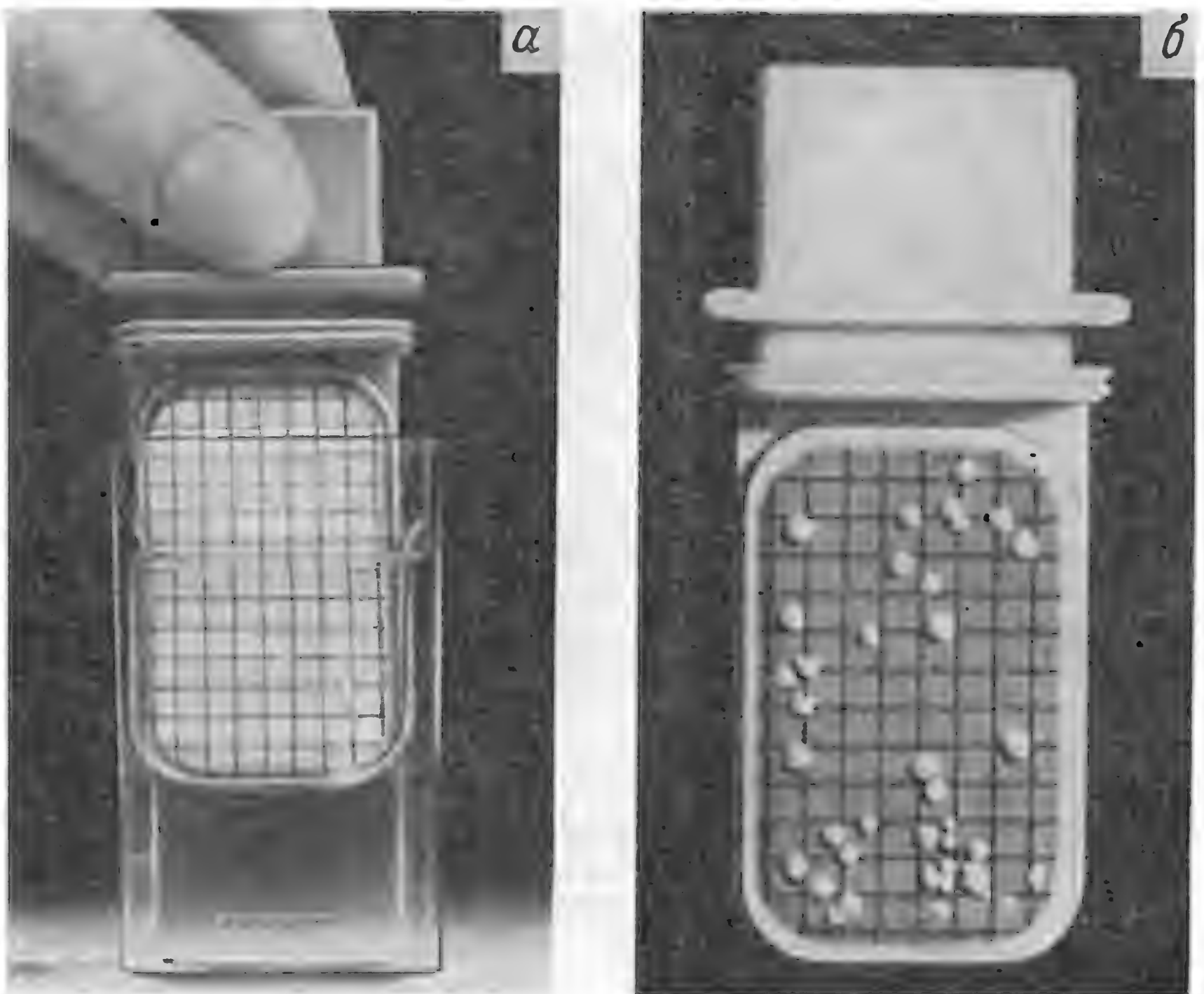


Рис. 9.6. а — погружение пробоотборника фирмы «Миллипор» в водную пробу; б — пробоотборник после инкубации с выросшими бактериальными колониями. (Фото любезно предоставлено фирмой «Миллипор».)

с ионообменными смолами. Пробоотборники стоят около 2 долл. за штуку, так что их можно считать не столь уж дорогими, если операции проводятся с небольшими объемами, когда затраты на устройство специальной лаборатории не могут быть оправданы.

Пробоотборник фирмы «Миллипор» с тампоном для определения бактериального загрязнения поверхностей (Swab Test Kit). Этот пробоотборник (рис. 9.7) представляет собой модификацию рассмотренного выше пробоотборника. В его комплект входит тампон, которым берут мазок с проверяемой поверхности. Тампон укреплен в камере, содержащей 1 мл буферного раствора, который предназначен для того, чтобы смыть микроорганизмы с тампона. После того как мазок взят и тампон помещен в камеру с буферным раствором, туда опускают пробоотборник. При этом микроорганизмы попадают на поверхность мембранного фильтра пробоотборника, которая далее обрабатывается, как было описано выше.

Крэйторн и др. [54] описывают применение пробоотборника фирмы «Миллипор» для взятия бактериологической пробы с влажных поверхностей. В этом пробоотборнике мембрана с размером пор 0,45 мкм была заменена на мембрану с порами 5 мкм. После приложения сухого пробоотборника к влажной поверхности в течение 5 секунд поверхность его мембраны смачивают 1 мл стерильной воды для увлажнения культуральной среды, и пробоотборник затем помещают для инкубации в футляр. Сравнение результатов подсчета бактерий этим пробоотборником с результатами, полученными на чашках методом Родака, который обычно используется для оценки бактериального загрязнения поверхностей, показало, что пробоотборник с тампоном обнаруживает значительно больше бактерий. Его можно также применять для взятия проб с поверхностей живых тканей при клинических исследованиях.

Хотя этот пробоотборник (Swab Test Kit) стоит дорого, он может быть весьма эффективным для санитарного контроля окружающей среды при производстве пищевых продуктов, напитков, а также при упаковке мяса, поскольку при этом отпадает необходимость в соответствующем лабораторном оборудовании.

Монитор фирмы «Миллипор» для микробиологического анализа (Millipor Monitor). Это устройство одноразового использования представляет собой мембранный фильтр, вставленный в пластиковый корпус. Сама дисковая мембрана (диаметром 37 мм с порами диаметром 0,45 или 0,8 мкм) прочно закреплена между секциями монитора вместе с целлюлозной прокладкой под ней, которая обеспечивает равномерное распределение водной пробы по поверхности мембраны, а также диффузию

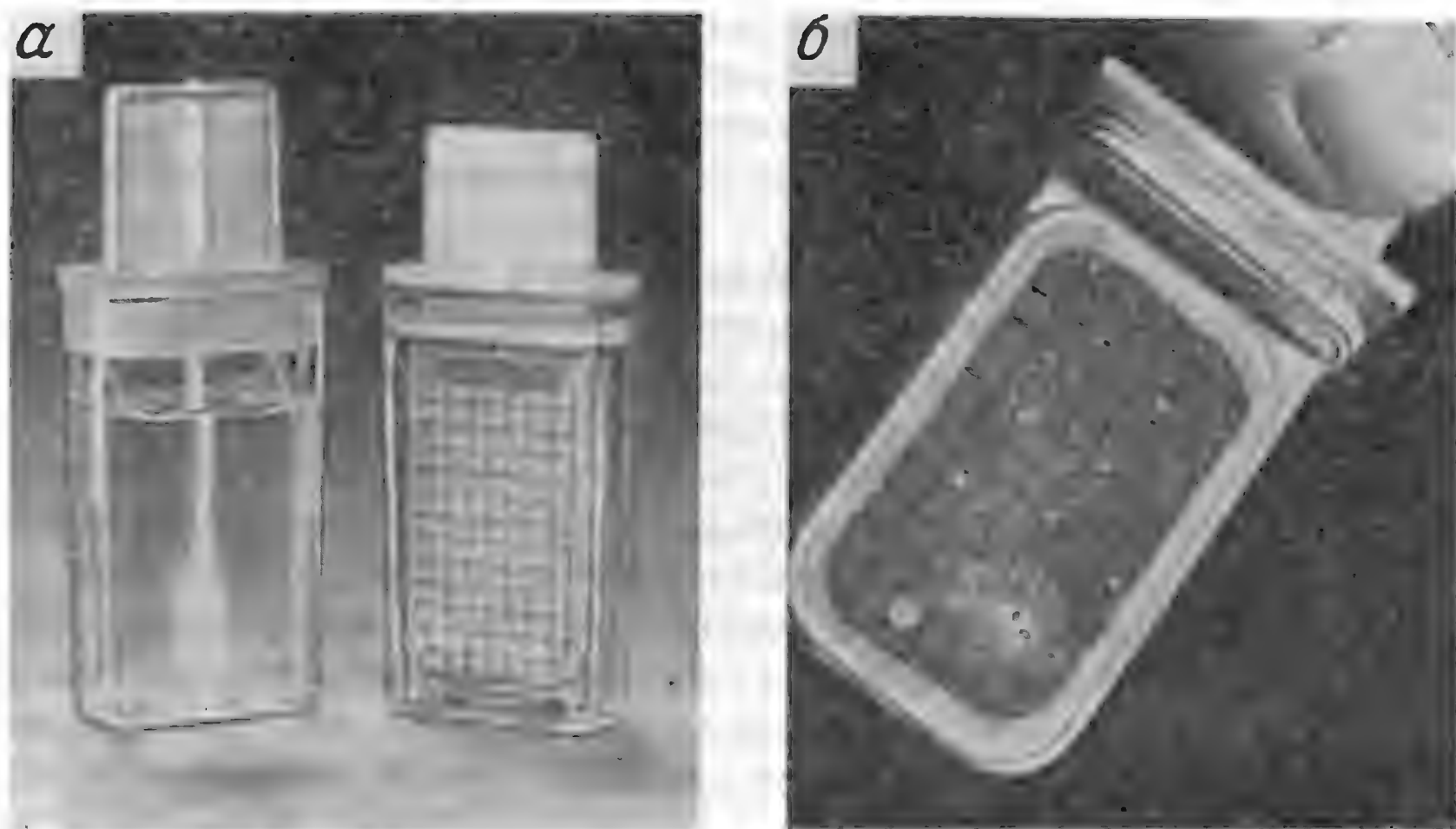


Рис. 9.7. *а* — пробоотборник фирмы «Миллипор» Swab Test Kit для взятия проб с поверхностей; *б* — колонии, выросшие на мембранном фильтре пробоотборника, использованного для анализа бактериальной загрязненности поверхности. (Фото любезно предоставлены фирмой «Миллипор».)

питательной среды через нижнюю поверхность мембраны. Монитор выпускают в двух модификациях: для анализа воды и для контроля качества напитков.

Монитор для анализа воды состоит из двух частей и имеет люеровские соединения на входе и выходе для подсоединения стерильного шланга и шприца. При работе стерильный шприц, снабженный двухходовым клапаном, подсоединяют к нижней части монитора, а стерильный пластиковый шланг подсоединяют со стороны мембраны (рис. 9.8, *а*). Монитор после этого переворачивают и другой конец шланга погружают в емкость с водной пробой; вода под вакуумом, создаваемым шприцом, затягивается в устройство через мембрану. Благодаря двухходовому клапану объем фильтруемой водной пробы может превысить емкость шприца. Затем монитор поворачивают в положение, показанное на рис. 9.8, *а* и всю оставшуюся в шланге воду продавливают через мембрану. Стерильную жидкую питательную среду вводят в основание монитора (рис. 9.8, *б*), который затем закупоривают стерильными колпачками (рис. 9.8, *в*), и помещают в портативный термостат на некоторое время, необходимое для инкубации. Монитор для анализа воды полезен в полевых условиях при контроле загрязнения окружающей среды. Цена монитора, по-видимому, приемлема при использовании его во многих областях, поскольку один прибор стоит менее двух долларов.

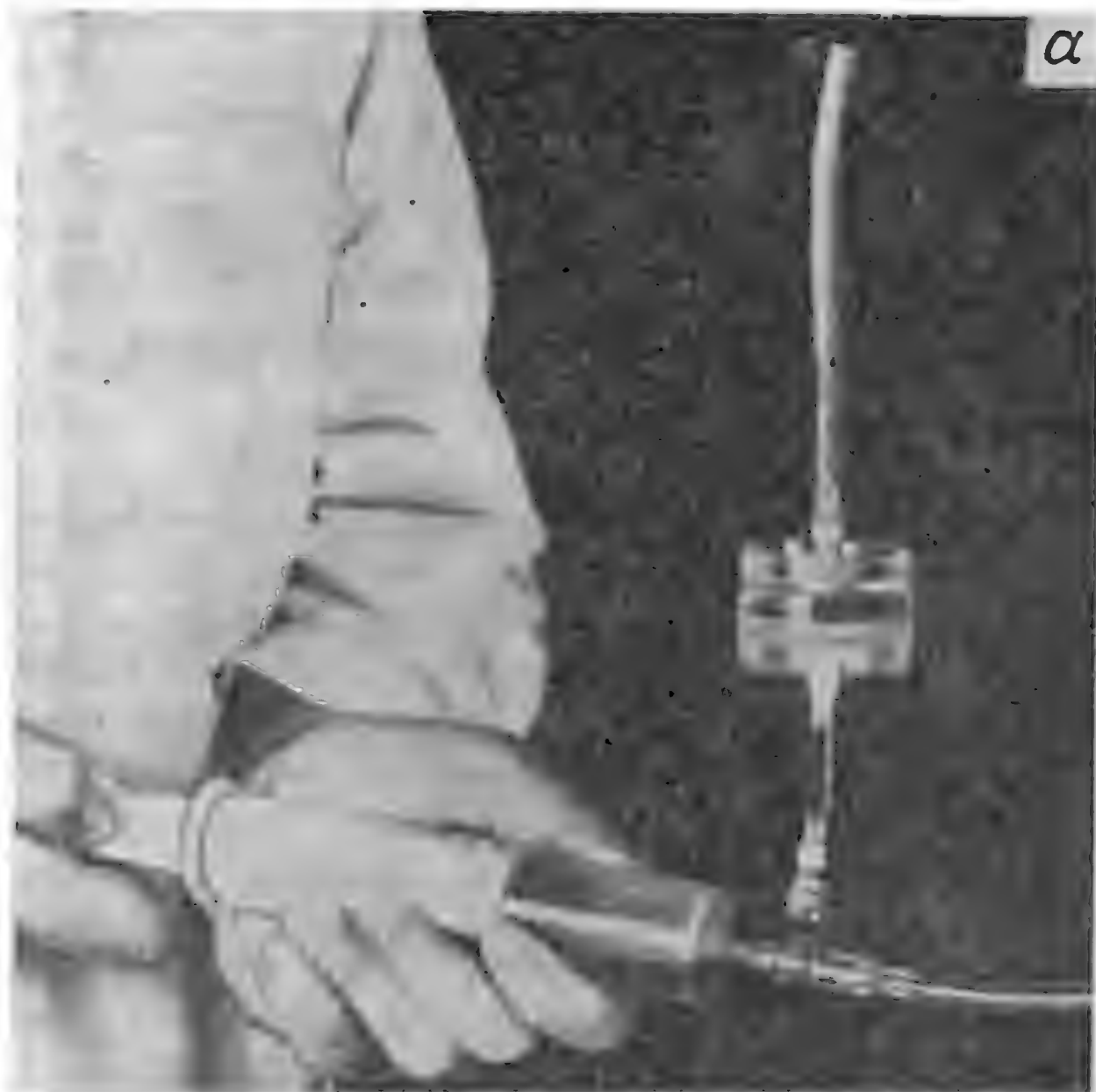


Рис. 9.8. Монитор фирмы «Миллипор». *а* — монитор, подсоединенный пластиковым шлангом к шприцу через двухходовой клапан; при работе прибор переворачивают и открытый конец шланга опускают в водную пробу; *б* — добавление стерильной питательной среды; *в* — закупоривание монитора перед инкубацией. (Фото любезно предоставлены фирмой «Миллипор».)

Монитор для контроля качества напитков действует по тому же принципу, но к нему добавляется третья секция, которая представляет собой небольшую воронку (емкостью 17 мл),

куда заливается проба. Это устраняет необходимость в шланге для отбора проб и исключает проблему вспенивания при анализе напитков, насыщенных углекислотой. Эти мониторы выпускаются с мембранами, имеющими поры 0,45 и 0,8 мкм (последние используются для подсчета дрожжевых клеток).

9.9. МИКРОБИОЛОГИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И НАПИТКОВ

Хотя методы мембранной фильтрации нашли широкое применение в микробиологических исследованиях качества воды (см. гл. 10), их редко применяют в микробиологии пищевых продуктов, если не считать исследовательских работ. За исключением немолочных напитков, для микробиологического контроля пищевых продуктов, предписываемого законодательными учреждениями, рекомендуется использовать более старые чашечные методы равномерного посева и розлива, а также методы инкубации во многих пробирках. С чем это связано?

Главная трудность при использовании методов мембранной фильтрации для пищевых проб заключается в тенденции многих продуктов, в особенности молочных, забивать поры мембран. (В разд. 8.5 мы описывали метод ферментативной обработки молока перед его фильтрацией, после которой следует прямой счет под микроскопом.) Другое неудобство состоит в том, что остающиеся на поверхности мембранного фильтра частицы пищи сильно затрудняют подсчет колоний. Третья проблема связана с тем, что подсчет бактерий на мембранном фильтре возможен лишь в ограниченном диапазоне их концентраций, что особенно мешает при работе с пищевыми продуктами, так как несколько проб одного и того же продукта могут широко различаться по содержанию микробов.

Мембранные фильтры с гидрофобной сеткой, рассмотренные в разд. 9.7, позволяют значительно расширить диапазон концентраций, в котором ведется подсчет микроорганизмов, и тем самым разрешают третью проблему, упомянутую в предыдущем абзаце. Забивание мембран можно существенно уменьшить, если из пищевых проб удалить (физическими методами или обработкой анализируемых проб ферментами) те компоненты пищи, которые приводят к этому забиванию. Основная физическая обработка состоит в механическом встряхивании кусочков пищи в сосуде с физиологическим или буферным растворами; при этом микробы выделяются из проб и переходят в раствор. Обработка протеазами и такими смачивающими агентами, как Твин-80, также значительно увеличивает фильтрационную способность многих пищевых продуктов. Более де-

тально с трудностями и методами мембранной фильтрации различных пищевых продуктов читатель может познакомиться в статье Шарпа и др. [193].

Фильтрация напитков. Несколько методов мембранной фильтрации для пищевых продуктов и напитков приведены в сборнике Американской ассоциации здравоохранения, выпущенном под редакцией Спекса [208]. Микробиологический анализ напитков вызывает меньше трудностей, чем анализ твердой пищи; вследствие этого большинство методов мембранной фильтрации, рекомендуемых в указанном сборнике, относится к напиткам. Среди напитков методы мембранной фильтрации особенно широко используются для контроля качества пива. Прежде чем проводить фильтрацию, пробу следует дегазировать, чтобы исключить закупорку пор мембран пузырьками газа. Высокое содержание в пиве органических веществ вызывает при вакуумной фильтрации значительное пенообразование, но его можно подавить добавлением к пробе нескольких капель октанола перед началом фильтрации. Поскольку мембранная фильтрация обычно используется для подсчета дрожжевых клеток, можно пользоваться мембранами с размером пор 0,8 мкм, которые меньше забиваются.

Мембранная фильтрация нередко применяется также при подсчете микроорганизмов в винах. По сравнению с белым вином красное вино быстрее приводит к забиванию пор мембраны. Поэтому при анализе красного вина следует разделить пробу и проводить фильтрацию через несколько отдельных мембран. Если мембрана в процессе фильтрации окрашивается или забивается, процесс выделения микроорганизмов и их подсчет затрудняются. После окончания фильтрации мембрану нужно промыть стерильным буферным раствором, прежде чем поместить ее в питательную среду. Если содержание спирта в вине много выше 12 %, нитроцеллюлозные мембраны применять нельзя, так как они будут набухать; вместо них нужно использовать ацетилцеллюлозные мембраны.

Если напиток содержит консервант, такой, как сорбиновая кислота или бензоат натрия, то после фильтрации пробы мембрану необходимо тщательно промыть стерильным растворителем, чтобы удалить любые следы этих ингибиторов.

Методы мембранной фильтрации позволяют оценить также санитарное состояние бутылей для упаковки пищевых продуктов. По рекомендуемой методике надо добавить в пустую бутылку 50 мл стерильного бульона или буфера и, осторожно вращая ее, обмыть изнутри всю поверхность исследуемой бутылки, после чего пропустить жидкость через стерильный мембранный фильтр для последующей оценки количества микроорганизмов.

9.10. ТРУДНОСТИ ПРИ ПОДСЧЕТЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

За годы, прошедшие с того времени, как техника мембранного фильтрования была впервые введена в практику для бактериологического контроля воды, качество мембранных фильтров значительно возросло. Однако решены отнюдь не все проблемы, возникающие при работе с ними. Как и для любого промышленного изделия, здесь наблюдаются отклонения от партии к партии и от изготовителя к изготовителю. В 1977 г., т. е. через 25 лет после того как промышленные мембранные фильтры впервые стали применяться для бактериологических исследований воды, состоялась конференция, посвященная решению проблем, связанных с этими исследованиями [35]. В качестве свидетельства того, сколь большой интерес был проявлен к этим вопросам в то время, приведем выдержку из доклада Гелдрейха [82], одного из наиболее опытных специалистов в области работ по исследованию качества воды:

«Не может быть никаких сомнений в том, что вопросы, связанные с мембранными фильтрами, реальны и требуют неотложного решения. Производители мембранных фильтров и питательных сред должны прислушаться к протестам отчаявшихся микробиологов и подвергнуть переоценке свою продукцию и программы контроля качества. Если этого не произойдет, то эти фирмы рискуют потерять свой многомиллионный рынок из-за роста недоверия к любым операциям с мембранными фильтрами с последующим отказом от этого ранее хорошо себя зарекомендовавшего лабораторного оборудования для микробиологических исследований воды. Сотрудников лабораторий не следует заманивать рекламными утверждениями о великолепной продукции, за которую мы платим, но которую на самом деле не можем получить. Мы тратим до 15 % рабочего времени на контроль качества партий мембранных фильтров и сред, а также на различные связанные с этим рутинные операции. Кроме того, исследователь вынужден включать соответствующие контрольные опыты во все эксперименты с мембранными фильтрами, чтобы разноречивый, вызванный этим источником, не искажил интерпретацию данных».

Какие же проблемы имел в виду Гелдрейх? Неравномерное распределение пор на поверхности мембран, наличие на ней гидрофобных участков, приводящих к неравномерному увлажнению и распределению бактерий; ограничения, обусловленные краской сеточных линий; нежелательные изменения свойств мембран после их стерилизации, а также плохая сохранность мембран (увеличение хрупкости и деформации поверхности мембран в процессе их хранения). Большие затруднения вызы-

вала практикуемая большинством изготовителей предварительная стерилизация мембран оксидом этилена, так как при этом наблюдается более низкое выделение микроорганизмов, чем в том случае, когда мембрана стерилизуется водяным паром. Максимальное время хранения, рекомендуемое для мембранных фильтров, составляет 18 месяцев, поскольку при старении они могут из-за потери эластичности разламываться в тех местах, в которых во время работы мембраны возникают напряжения. Деформация поверхности мембраны может сделать невозможным ее контакт с расположенной под ней питательной средой, что приведет к неравномерному росту колоний.

Затруднения при подсчете жизнеспособных микроорганизмов вызываются не одними лишь мембранами. За дополнительные расхождения в результатах могут нести ответственность также пористые подложки, содержащие питательную среду, и сама среда. Размер и число выросших колоний на мембранах, размещенных на бумажной пористой подложке, могут оказаться меньше, чем на среде с агаром. Это может происходить, если подложка содержит токсичные вещества, такие, как сульфиты или кислоты, сохранившиеся с момента изготовления бумаги, или если подложка адсорбирует некоторые из питательных компонентов, существенных для роста микроорганизмов. Гелдрейх [82] для удаления токсичных веществ, оставшихся в пористых подложках, рекомендует предварительно смоченные подложки помещать в дистиллированную воду и все это выдерживать в автоклаве при температуре 121 °C в течение 15 мин, а затем промыть их и вновь упаковать для стерилизации при температуре 121 °C в течение 15 мин, после чего быстро их просушить с использованием вакуума.

Гелдрейх указывает также, что питательные среды, выпускаемые для мембранной фильтрации, могут различаться по качеству и служить дополнительным источником расхождений в результатах подсчета. Результаты подсчета зависят также от наличия и активности ингибиторов, которые предохраняют мембранные фильтры от роста на них нежелательных микроорганизмов. Ингибиторы, такие, как основной фуксин, анилиновый голубой и желчные соли, могут различаться по качеству, и изготовитель питательных сред должен проверять каждую партию химикатов, чтобы удостовериться, что она отвечает операциям, предназначенным для мембранной фильтрации. (Указанная проблема изменчивости состава питательных сред играет, бесспорно, важную роль и в операциях, не связанных с мембранной фильтрацией.)

Наконец, постоянным источником получения неправильных результатов являются погрешности, вносимые самим оператором. В любой лаборатории, в которой ведутся работы, связан-

ные с контролем качества и стандартизацией, должно уделяться особое внимание «тренировке» лаборантов с целью выработки у них хороших профессиональных навыков. Персонал лаборатории должен быть всегда готов к тому, чтобы уметь преодолевать любые затруднения и неполадки, возникающие при мембранной фильтрации.

9.11. ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ АГЕНТОВ

Подсчет жизнеспособных микроорганизмов используют, чтобы измерить активность антимикробных агентов, и мембранные фильтры идеально подходят для проверки бактерицидного действия таких агентов. С помощью мембранных фильтров можно оценить антимикробное действие антибиотиков, антисептических и дезинфицирующих средств. Чтобы количественно определить бактерицидное действие химического вещества, подсчет должен проводиться после того, как это вещество находилось в контакте с микробными клетками в течение определенного периода времени. Но, прежде чем проводить подсчет оставшихся микроорганизмов, их нужно отделить от химического соединения, поскольку в противном случае действие последнего может продолжаться во время инкубации. С помощью мембранной фильтрации нетрудно осуществить такое разделение химического вещества и микроорганизмов, и подсчет микроорганизмов можно выполнить, проводя инкубацию мембранного фильтра, содержащего клетки, на какой-либо питательной среде при полном отсутствии химического вещества.

Стандартные методы испытания дезинфицирующих средств в основном утверждаются Ассоциацией аттестованных химиков-аналитиков. В настоящее время эти методы не предусматривают применение мембранных фильтров. Вместо этого для улавливания микроорганизмов, подлежащих испытанию, они рекомендуют использовать определенного рода адсорбент, который затем в конце периода времени, необходимого для контакта, переносится, чтобы отделить эти клетки от токсичного агента [111]. Недостаток этого метода состоит в том, что клетки могут вымыться с поверхности адсорбента и сделать таким образом всю операцию бессмысленной. Кроме того, до начала подсчета клетки должны быть элюированы с адсорбента. При работе с мембранными фильтрами обе эти проблемы исключаются.

Ко и Вандервик [128] приводят подробное описание операции по проверке дезинфицирующих средств с помощью мембранных фильтров. Эта операция проводится следующим образом. Испытуемые микроорганизмы сперва захватываются мемб-

раной, а затем (после отключения вакуума, но без удаления мембраны из фильтродержателя) добавляется дезинфицирующий раствор (5 мл). После определенного времени контакта (обычно 60 минут) через мембрану несколько раз пропускают промывочный раствор и переносят ее на подходящую питательную среду с агаром для инкубации и последующего счета. В этой операции, чтобы избежать затруднений из-за просачивания ингибитора в зазор между мембраной и фильтродержателем, откуда его трудно вымыть, следует использовать мембраны с гидрофобными краями.

Плотность испытуемых клеток, использованных для улавливания на мембране, должна быть такой, чтобы после действия агента оставалось достаточное для значащего счета количество жизнеспособных клеток; это обычно определяют методом проб и ошибок. В этом случае можно с большим успехом использовать мембранные фильтры с гидрофобной сеткой (см. разд. 9.7), поскольку они позволяют работать с более высокими плотностями клеток.

9.12. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе мы рассмотрели ряд методов и операций, которые можно использовать для подсчета жизнеспособных микроорганизмов. В гл. 10 мы обсудим более подробно методы подсчета бактерий при анализе воды. В настоящей же главе мы рассмотрели общие принципы и некоторые ограничения соответствующих методов подсчета микроорганизмов, а также предупредили о тех мерах предосторожности, которые необходимо предпринимать при этом. Метод мембранной фильтрации следует применять для подсчета жизнеспособных микроорганизмов только в том случае, когда плотность их популяции мала и роль мембраны состоит в том, чтобы сконцентрировать микроорганизмы до необходимой для подсчета колоний плотности. Однако этим методом можно анализировать и пробы с более высокой концентрацией микроорганизмов, если необходимо перенести их колонии в дополнительную диагностическую среду или реагент. Возможность переноса целой коллекции колоний в *нетронутom виде* из одной среды в другую представляет значительную ценность во многих диагностических процедурах.

При переходе от общепринятого чашечного метода к методу мембранной фильтрации состав питательной среды для подсчета микроорганизмов, как правило, изменяют. Это связано с тем, что матрица мембранного фильтра способна поглощать некоторые компоненты питательной среды и понижать

тем самым их концентрацию. Поэтому, например, ингибиторы, используемые в методах дифференциального подсчета, представляют наиболее обычные ингредиенты среды, концентрации которых должны быть соответствующим образом изменены при переходе от чашечных методов к мембранным. Фирмы-изготовители питательных сред выпускают для мембранной фильтрации, как правило, специальные их серии, обозначаемые буквами «М» или «MF».

Поскольку подсчет микроорганизмов представляет собой процедуру столь высокой чувствительности, нельзя мириться с тем, что качество мембранных фильтров может меняться от партии к партии. Изготовители мембранных фильтров должны руководствоваться принципом: «Никаких дефектов!», чтобы потребитель не тратил чрезмерного времени на проведение операций по контролю качества выпускаемой ими продукции.

Глава 10

Микробиологическая проверка воды

10.1. ВВЕДЕНИЕ

Главная цель настоящей главы — обсудить применение мембранных фильтров для микробиологического анализа воды. Это целая область исследований, которую иногда называют «микробиологией воды». Мы будем рассматривать применение мембранных фильтров главным образом для обнаружения БГКП, или подсчета колиформ. Однако мы уделим определенное внимание также и обнаружению с помощью мембранной фильтрации и других бактерий, влияющих на санитарное состояние среды. Здесь уместно ввести понятие **микроорганизма-индикатора**. Это, как правило, непатогенный микроорганизм, наличие которого в воде связано с ее загрязнением сточными водами и который используется, чтобы обнаружить возможное присутствие истинно патогенных микроорганизмов. Последние, такие, как *Salmonella* и *Shigella*, обычно разносятся водой, но их количество в воде трудно определить. В то же время такие микроорганизмы, как БГКП, которые непатогенны и в норме непременно присутствуют в кишечнике человека, могут быть легко подсчитаны. Таким образом, наличие значительного числа этих бактерий в водной пробе свидетельствует о загрязнении воды стоками. Количественное определение микроорганизма-индикатора является основой санитарной бактериологии и в ряде случаев приобретает силу закона. Мембранная фильтрация является юридически признанным методом проверки качества питьевой воды и поверхностных вод, которые могут вступить в контакт с человеком. Если с помощью мембранной фильтрации будет установлено, что число подсчитанных бактерий превышает норму, то это может вызвать со стороны законодательных органов целый ряд принудительных мер. Поэтому жизненно важно, чтобы операции, связанные с мембранной фильтрацией, выполнялись правильно, а качество самих мембранных фильтров соответствовало необходимым требованиям.

Представляет исторический интерес тот факт, что промышленное производство мембранных фильтров после второй

мировой войны было вызвано той огромной пользой, которую они принесли санитарной бактериологии [47, 89]. Став доступными, мембранные фильтры проложили себе дорогу для самых разнообразных применений, что и рассматривается в этой книге. В настоящее время санитарная бактериология — это лишь небольшая, хотя и важная, область среди многочисленных приложений, в которых используются мембранные фильтры.

10.2. ЗНАЧЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ

Почему же мембранные фильтры получили столь большое признание в санитарной бактериологии? Чтобы понять это, следует ознакомиться с более старым (все еще принятым и часто используемым) методом оценки бактериологического качества воды, а именно с методом инкубации проб в пробирках, или методом НВЧ. Согласно этому методу, одинаковые объемы водной пробы помещают в пять пробирок, содержащих подходящую для БГКП питательную среду. В случае питьевой воды используют неразбавленные пробы по 10 мл на пробирку, а для анализа неочищенной воды и сточных вод обычно берут три 10-кратных разведения исследуемой пробы, т. е. всего 15 пробирок. После инкубации в течение 24—48 ч присутствие БГКП обнаруживается по наличию пузырька газа в перевернутой склянке, опущенной в каждую из пробирок с культурой. Количество БГКП, подсчитанное в этом методе, представляет собой статистическую величину, получаемую путем подсчета числа пробирок, в которых выделился газ. На этой стадии только *предполагается*, что пробирки содержат БГКП, а чтобы подсчет стал достоверным, необходимо показать, что пробирки, в которых выделился газ, действительно содержат БГКП. Это требует двух дополнительных испытаний, названных *подтверждающим* и *завершающим*, на что уходит еще 2 сут. Таким образом, при положительной водной пробе на проведение анализа этим методом уходит 3 сут.

При использовании же мембранной фильтрации вся процедура занимает всего лишь один день. Водную пробу пропускают через подходящий мембранный фильтр, который помещают на селективную предназначенную для индикации БГКП среду. Число бактерий определяется прямым подсчетом количества соответственно окрашенных колоний. При этом предположительное, подтверждающее и завершающее испытания проводят в одну стадию. (В некоторых случаях требуется дополнительный контроль, чтобы удостовериться в присутствии колоний; на это уходит меньше времени, чем на подтверждающее и завершающее испытания в случае подсчетов по методу

НВЧ.) Кроме того, в методе мембранной фильтрации число БГКП определяется не статистически, а устанавливается прямым подсчетом числа колоний, появившихся на инкубированной мембране.

Преимущества метода мембранной фильтрации. Применительно к анализу воды мембранная фильтрация имеет ряд следующих преимуществ по сравнению с методом НВЧ.

1. *Объем пробы.* Объем воды, который может быть проверен методом НВЧ, ограничен примерно 10 мл на пробирку при общем объеме 50 мл на 5 пробирок. Метод же мембранной фильтрации позволяет профильтровать любой объем пробы в разумных пределах. Согласно стандартам на питьевую воду, необходимо фильтровать по меньшей мере 100 мл, но можно отфильтровать 200, 500 или даже 1000 мл. Таким образом, мембранная фильтрация оказывается значительно более чувствительной при обнаружении низких уровней загрязнения.

2. *Точность.* Точность метода НВЧ определяется главным образом числом используемых пробирок, а не плотностью бактерий. Стандартная ошибка при отборе проб может быть очень малой лишь при использовании большого числа пробирок (много больше, чем 5). Точность же метода мембранной фильтрации зависит в первую очередь от числа положительных колоний¹, подсчитанных на одной мембране. Таким образом, точность счета на мембранном фильтре можно увеличить, просто фильтруя больше воды, чтобы увеличить тем самым число положительных колоний. В табл. 10.1 представлены объемы исследуемых проб воды, позволяющие сравнить по точности методы НВЧ и мембранной фильтрации [220]. Из этой таблицы следует, что мембранная фильтрация имеет бóльшие преимущества при анализах вод с высоким содержанием БГКП, таких, как неочищенная вода или поверхностные воды. При анализе питьевой воды, где величина НВЧ не ожидается большой, метод мембранной фильтрации для тех объемов пробы, для которых он обычно применяется (100 мл пробы), не имеет особых преимуществ с точки зрения точности, хотя другие его положительные стороны, перечисленные в этом разделе, еще сохраняются. Если же фильтрации подвергаются большие объемы, то точность этого метода также возрастает.

3. *Воспроизводимость.* По сравнению с методом НВЧ мембранная фильтрация дает более воспроизводимые результаты даже без учета различных ошибок при отборе проб, рассмотренных в предыдущем абзаце.

4. *Время.* В случае мембранной фильтрации время, затрачиваемое на подсчет, и трудоемкость операций намного меньше,

¹ То есть колоний, относящихся именно к БГКП.— *Прим. ред.*

чем в методе НВЧ. При подсчете первым методом достаточно 24 ч, тогда как для второго метода (если пробирки выделили газ) требуется 48—96 ч.

5. *Материалы.* Применение метода мембранной фильтрации требует меньшего количества питательных сред, стеклянной посуды, операций стерилизации.

Таблица 10.1. Сравнение методов мембранной фильтрации (МФ) и НВЧ при различных объемах исследуемых модельных проб и концентрациях в них БГКП [220]

Объем (мл) отфильтрованной воды, содержащей 1 ед. БГКП на 100 мл	Объем (мл) отфильтрованной воды, содержащей 5000 ед. БГКП на 100 мл	Метод МФ	Метод НВЧ*
		число колоний, подсчитанных на отдельной мембране	число проросших пробирок
100	0,02	1	2
1 000	0,2	10	9
10 000	2,0	100	69

* Результаты, полученные при многих разбавлениях содержимого одной пробирки, дают одно значение НВЧ. В случае питьевой воды для этого необходимы пробирки объемом 100 мл.

6. *Стоимость.* Мембранная фильтрация по сравнению с методом НВЧ позволяет подвергнуть анализу большее количество проб; при этом расход материалов увеличивается незначительно. Следовательно, общая стоимость анализов воды уменьшается [98].

7. *Токсичные вещества.* Если водная проба содержит токсичные или потенциально токсичные по отношению к БГКП вещества, то мембранная фильтрация становится единственным методом, которым можно пользоваться. При этом БГКП отделяются от токсичных веществ, в то время как при методе НВЧ токсичные материалы попадают внутрь пробирок с культурой как часть инокулята.

Недостатки метода мембранной фильтрации. Этот метод имеет ряд недостатков, так что в некоторых случаях следует предпочесть метод НВЧ.

1. *Мутность.* Некоторые пробы невозможно фильтровать из-за мути, которая вызывает преждевременное забивание мембран. Даже если фильтрация может произойти, муть, задерживаемая мембраной, может блокировать или маскировать колонии БГКП. Это ограничение зависит от типа суспензии. Относительно тонкие слои желеобразных, мелкодисперсных или гигроскопических веществ (например, хлопья производных же-

леза, марганца, алюминия, а также водоросли) могут забивать поры фильтра или вызывать образование в процессе инкубации пленки бактериального материала. С другой стороны, более толстые слои минеральных веществ (например, силикатов) не вызывают больших затруднений. Наличие мутности вызывает осложнения, только если величина мутности большая, а содержание БГКП невелико. Если же в пробе воды находится большое количество БГКП, то для фильтрации достаточно нескольких миллилитров пробы и наличие мутности не вызывает особых затруднений.

2. *Микроорганизмы, конкурирующие с БГКП.* Высокое содержание микроорганизмов, не относящихся к БГКП и способных расти на данной культуральной среде, может ингибировать рост или препятствовать развитию характерной для колоний БГКП окраски. Такого же рода затруднения могут возникнуть и в случае метода НВЧ, поскольку высокое содержание не относящихся к БГКП микроорганизмов при малом содержании БГКП может ингибировать рост последних также и в пробирках. Однако используемая в методе мембранной фильтрации селективная среда менее способна справиться с их чрезмерным ростом, чем среда, применяемая в методе НВЧ.

3. *Токсичность соединений тяжелых металлов.* Ионы и соединения некоторых тяжелых металлов прочно связываются с матрицей мембранного фильтра, и их токсичность может препятствовать проявлению БГКП. Токсичность, вызванная примесями тяжелых металлов, создала особые трудности с сильно загрязненными промышленными отходами, в которых могли присутствовать цинк или медь [81].

4. *Испытания на ФКП с помощью мембранной фильтрации* представляют собой специальный тест на БГКП, применяемый для анализа загрязненных вод; при этом возникают некоторые специфические трудности, которые мы рассмотрим в разд. 10.5 и 10.6.

10.3. СРАВНЕНИЕ ИСПЫТАНИЙ НА БГКП И ФКП

Согласно санитарной бактериологии, БГКП не имеет реального бактериологического обозначения. Бактериологическая систематика не выделяет БГКП ни в отдельный вид, ни даже в отдельное семейство или отряд. Скорее, в целях удобства санитарный бактериолог понимает под *БГКП* группу микроорганизмов, которые отвечают определенным критериям и обнаруживаются с помощью конкретного культурального метода. БГКП являются бактериями-индикаторами и, как упоминалось выше, представляют интерес благодаря тому, что с их

помощью обнаруживается действительное или возможное загрязнение воды. Для санитарного бактериолога неважно, если эта группа определена слишком широко, а не ограничена отдельным родом или видом. Широкое определение группы привело бы лишь к излишней осторожности, в то время как слишком узкое определение могло бы случайно привести к неумышленному преступлению.

Вот почему при контроле питьевой воды определение БГКП дается столь широким, что множество непатогенных и даже некишечных микроорганизмов будет выделено и сочтено. Не имеет значения, что мы можем извлечь их даже из нашей питьевой воды (лучше перестраховаться).

Однако для оценки чистоты непитьевых вод, таких, как реки, озера, океаны, плавательные бассейны и другие водные объекты, с которыми человек имеет дело, такое определение включает слишком много микроорганизмов, которые не связаны с кишечным загрязнением и могут в результате мешать нам в поисках источников загрязнения. Для поверхностных вод, куда кишечные патогенные бактерии могут попасть со сточными водами, необходимо иметь тест, который позволял бы проверить непосредственно те бактерии, которые действительно находятся в кишечном тракте. С этой целью был разработан **тест на ФКП**. Это испытание отличается от теста на БГКП прежде всего более высокой температурой инкубации ($44,5^{\circ}\text{C}$ вместо 35°C). При такой повышенной температуре рост микроорганизмов некишечного происхождения менее вероятен, в то время как большинство кишечных бактерий (патогенных и непатогенных) может размножаться. В действительности температура $44,5^{\circ}\text{C}$ несколько высока даже для кишечных микроорганизмов, она почти равна верхнему температурному для них пределу; поэтому тест на ФКП создает некоторый стресс для этих бактерий. Действие температуры в сочетании с другими видами стрессовых воздействий (например, обработка воды хлором) усложняет до некоторой степени тест на ФКП. Действительно, большинство нареканий, связанных с использованием мембранных фильтров в суммарном тесте на БГКП (см. разд. 10.6), относилось скорее к ФКП, нежели к БГКП, и многие из этих жалоб вызваны тем, что микроорганизмы, подвергнутые сильному стрессу, зачастую не могут быть правильно подсчитаны.

Так как же определить БГКП? Согласно Американской ассоциации здравоохранения [3], к БГКП относятся все аэробные и факультативные анаэробные грам-отрицательные, неспорообразующие, палочковидные бактерии, которые в течение 48 ч при температуре 35°C ферментативно расщепляют лактозу с образованием газа.

Это определение, юридически установленное законом США о безопасности питьевой воды, применимо лишь к методу НВЧ, поскольку лишь в этом методе обнаруживается газообразование. Для метода мембранной фильтрации Американская ассоциация здравоохранения дает другое определение БГКП, которое формулируется следующим образом.

В случае метода мембранной фильтрации к БГКП относятся все аэробные и факультативные анаэробные палочковидные бактерии, которые на лактозной среде Эндо в течение 24 ч образуют темные колонии с золотисто-зеленым металлическим блеском.

В самом начале, когда только появился метод мембранной фильтрации, было установлено [47, 123], что различные питательные среды, которые хорошо себя зарекомендовали в случае характерных колоний БГКП, посеянных обычными штриховыми методами на чашках с агаром, оказались неудовлетворительными для мембранных фильтров. Как отмечалось в разд. 9.4, одна из главных трудностей состоит в том, что мембранный фильтр поглощает красители и ингибиторы, используемые в дифференциальных средах, делая их, таким образом, неэффективными. Большая работа была проведена многими исследователями, чтобы создать различные подходящие среды для БГКП, и, как было в конце концов показано, наиболее удачной оказалась модифицированная среда Эндо. В табл. 9.1 мы провели сравнение обычной среды Эндо, используемой в чашечном методе, с модифицированной средой М-Эндо, подходящей для метода мембранной фильтрации.

Для теста на ФКП среда М-Эндо, используемая для анализа БГКП, неприемлема, и нужно пользоваться специальной средой М-ФС. Как и среда М-Эндо, эта питательная среда содержит лактозу, но краситель, указывающий на расщепление последней ферментами бактерий, уже не основной фуксин, а анилиновый голубой [83].

Как при испытаниях на ФКП, так и при испытаниях на БГКП мембранные фильтры инкубируют после фильтрации, помещая их на поверхность слоя 1—1,5 % агара, содержащего соответствующую питательную среду, или на подложку из фильтровальной бумаги, насыщенную культуральной средой (см. разд. 9.3). Последнюю операцию, вообще говоря, предпочтительнее проводить в лабораторных условиях при выполнении многочисленных анализов, так как она исключает процедуру разливания в чашки Петри раствора агара с питательной средой.

10.4. ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА
НА БГКП

Очень подробное описание теста на БГКП приводится в Стандартных методах Американской ассоциации здравоохранения [3] и в работе Гелдрейха [81]. При этом должны быть приняты все предосторожности с целью соблюдения асептических условий и тщательно проведена стерилизация фильтродержателей и оборудования; этот вопрос мы рассматривали в гл. 6, 7 и 9. Если анализируемая вода хлорирована, то перед взятием пробы ее необходимо обработать дехлорирующим агентом, таким, как тиосульфат натрия. Если анализ пробы нельзя провести сразу, то пробу нужно хранить в холодном месте, причем в любом случае время между взятием пробы и началом анализа не должно превышать 30 ч. Объем воды, который должен быть отфильтрован, зависит от водного источника. В табл. 10.2 мы привели рекомендуемые объемы проб для испытания

Таблица 10.2. Рекомендуемые объемы проб воды из различных источников для испытания на БГКП с помощью мембранной фильтрации [3]

Водный источник	Подлежащий фильтрации объем, мл							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Питьевая вода	×							
Плавательные бассейны	×							
Колодцы, родники]	×	×	×					
Озера, водохранилища	×	×	×					
Водоразборные устрой- ства			×	×	×			
Купальные пляжи			×	×	×			
Речная вода				×	×	×	×	
Хлорированные сточные воды				×	×	×		
Неочищенные стоки					×	×	×	{×

на БГКП методом мембранной фильтрации. Если нужно отфильтровать малые объемы воды (например, в случае большого содержания микробов), то пробу нужно разбавить стерильным растворителем таким образом, чтобы объем фильтруемой жидкости был не менее 20 мл. Это можно сделать, добавив в воронку фильтродержателя со вставленной в нее мембраной вначале растворитель, а затем с помощью пипетки водную пробу. Большой объем воды обеспечивает равномерное распределение бактерий в пробе по всей фильтрующей поверх-

ности. После фильтрации воронку с мембранным фильтром промывают несколько раз порциями стерильного буферного раствора по 20—30 мл каждая. Мембрану аккуратно удаляют стерильным пинцетом, которым ее поддерживают только за участки поверхности, расположенные вне фильтрующей зоны.

Если серии проб имеют примерно одинаковые количества БГКП, то можно использовать один фильтрационный аппарат, который был стерилизован в начале фильтрации этой серии. Если фильтрацию серии проб необходимо прервать более чем на 30 мин, то потом следует использовать свежестерилизованный фильтрационный аппарат. Быстрая стерилизация оборудования может быть осуществлена с помощью ультрафиолетового стерилизатора, а также под струей пара или в кипящей воде.

Мембранный фильтр прикладывают к пористой подложке, прокатывая по ее поверхности таким образом, чтобы предотвратить образование пузырьков воздуха. Наилучшие результаты получают, если предварительно провести операцию обогащения, при которой мембранный фильтр, содержащий микроорганизмы, преинкубируется при температуре 35 °С в течение 1,5—2 ч на пористой подложке, насыщенной лаурилтриптозным бульоном при температуре 35 °С. Такая преинкубация рекомендуется при анализе качества питьевой воды, но не считается необходимой при проверке непитьевой воды или сточных вод. После преинкубации (если она проведена) мембрану переносят на среду М-Эндо (либо на пористую подложку, пропитанную жидкой средой, либо в чашку с агаром) и инкубируют в течение 20—22 ч при температуре 35 °С.

Чашки, в которых мембраны помещены на пористые подложки, должны иметь плотно закрывающиеся крышки, или же их следует инкубировать в инкубаторе с высокой влажностью, чтобы избежать избыточного испарения в процессе инкубации.

Опознавание типичной колонии БГКП требует некоторой практики, которую лучше всего приобрести в совместной работе с опытным сотрудником. Типичная колония БГКП имеет окраску от розовой до темно-красной и поверхность с металлическим блеском. Блестящая поверхность может охватывать всю колонию, а может быть размером с булавочную головку. Подсчет лучше всего производить, пользуясь микроскопом для препарировальных работ с небольшим (10—15×) увеличением. Для освещения мембраны используют флюоресцентную лампу, расположенную таким образом, чтобы создать максимальное отражение от колоний с металлическим блеском. Лучше всего, если число колоний на мембране будет равно 20—80, но, безусловно, меньше 200. Если вода является питьевой, то это число будет меньше 20, а возможно, и равно 1. При таких низких числах нельзя говорить о статистической точности; единствен-

ный способ, который позволяет получить высокую степень точности счета,— это фильтрация пробы большего объема. Если число колоний превышает 200, то анализу следует подвергнуть другую пробу с меньшим фильтруемым объемом. В табл. 10.3 приведены пределы 95 %-ной достоверности подсчета для различного числа колоний на мембранном фильтре.

Таблица 10.3. Пределы 95%-ной статистической достоверности для различного числа колоний на мембранном фильтре при использовании проб объемом 100 мл [3]

Число подсчитанных колоний БГКП	Пределы 95%-ной достоверности	
	нижний	верхний
1	0,05	3,0
2	0,35	4,7
3	0,81	6,3
4	1,4	7,7
5	2,0	8,2

Если колонии, принятые за колонии БГКП, найдены в питьевой воде, то необходимо удостовериться в том, что это действительно БГКП. Для этого колонии собирают, переносят в лаурилтриптозный или лактозный бульон и инкубируют в течение 24—48 ч при температуре 35 °С, а затем проверяют на выделение газа. Содержимое пробирок, давших положительный результат, для дополнительного подтверждения переносят в лактозный бульон с бриллиантовым зеленым и проверяют на выделение газа после инкубации в течение 24—48 ч при температуре 35 °С. Если число предполагаемых колоний БГКП мало, то все эти колонии необходимо проверить, а затем вычислить процент колоний БГКП, поддающихся проверке. Процедура верификации представляет собой существенную часть самообучения специалиста, с тем чтобы он мог без труда идентифицировать колонии БГКП на мембране. Это играет также важную роль, если обнаружение БГКП должно быть использовано при каких-либо контрольно-юридических акциях [81]. Самая большая трудность, с которой приходится сталкиваться неопытному работнику, состоит в том, чтобы решить, являются ли колонии темно-красного цвета, но без блестящей поверхности колониями БГКП. Определенные трудности возникают, если флюоресцентная лампа, используемая для проверки мембран, отрегулирована неправильно. Единственно, что остается неопытному работнику, это постоянно практиковаться, в частности, подвергая трудоемкой проверке сомнительные

колонии. При проведении любой операции, связанной с мембранной фильтрацией, могут возникнуть те или иные неполадки; некоторые из них были проиллюстрированы на рис. 9.3. Некоторые из этих неприятностей обусловлены неправильным обращением с мембраной, другие — с наличием посторонних материалов в водных пробах.

Лаборатории, проводящие испытания на БГКП при контроле питьевой воды в соответствии с законом США о безопасности питьевой воды, должны иметь разрешение штатного или Федерального агентства по охране окружающей среды. Одно из таких агентств (Цинциннати, шт. Огайо) время от времени проводит краткосрочные курсы для лаборантов. Штат сотрудников, составляющий лабораторию по проверке на БГКП, должен быть хорошо обучен, а лаборантов, выполняющих эту работу, следует тщательно контролировать.

Американская ассоциация по охране здоровья предписывает [3] проведение операции по подсчету БГКП с задержкой инкубации в случае, когда проба должна быть доставлена из отдаленного места с целью инкубации и проведения теста. Специально предназначенная для транспортировки среда (LES MF) сохраняет БГКП жизнеспособными и в то же время препятствует их явному росту благодаря наличию в ней бактериостатических агентов. После того как мембрана доставлена в лабораторию, ее инкубируют в среде М-Эндо. Для анализа воды в отдаленных местах, где отсутствуют электроэнергия и соответствующее оборудование, очень полезны шприц-насадки. Большинство изготовителей мембранных фильтров выпускают эти устройства в том или ином виде, часто предварительно стерилизованными и с уже вложенной в них мембраной. Например, монитор фирмы «Миллипор» для бактериологического анализа состоит из готового к употреблению пластмассового фильтродержателя со шприцем, снабженного мембраной с порами 0,45 мкм (см. разд. 9.8).

10.5. ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ТЕСТА НА ФКП

Как мы уже отмечали, испытания на ФКП проводятся для того, чтобы отличить БГКП кишечного происхождения от БГКП, связанных с другими источниками, такими, как почва или естественные воды. Тест на ФКП используется в анализе загрязнения рек при контроле систем обработки стоков, вод, предназначенных для купания (пресных и морских), и для проверки вод, которые должны быть очищены для питья.

В этом испытании инкубация должна проводиться при повышенной температуре ($44,5\pm0,2^{\circ}\text{C}$). Поскольку такая температура инкубации близка к верхнему температурному пределу для кишечных БГКП и является критической, чашки, содержащие мембранные фильтры, должны инкубироваться в водяной бане, а не в воздушном инкубаторе. Температуру водяной бани следует точно устанавливать и часто проверять (не реже раза в день). Водяную баню необходимо плотно закрыть крышкой, чтобы замедлить испарение и предотвратить охлаждение поверхностного слоя. Наилучшей является водяная баня с циркулирующей водой, поскольку это гарантирует равномерное распределение температуры. В процессе инкубации чашки, содержащие мембранные фильтры, помещаются в водонепроницаемые пластиковые пакеты и полностью погружаются в воду. Следует подчеркнуть, что погружение *должно быть* полным, чтобы температура чашек не опустилась ниже температуры водяной бани.

Объем пробы воды, подлежащей фильтрации, определяется содержанием бактерий. Как было отмечено в разд. 9.3, число колоний на мембране после инкубации должно находиться в пределах 20—80. Поскольку для воды, подвергаемой тесту на ФКП, диапазон значений при подсчете может оказаться достаточно широким, так что для каждого конкретного источника приходится брать пробы разного объема. В табл. 10.4 мы представили некоторые рекомендуемые объемы проб, причем для каждого анализируемого образца необходимо взять по меньшей мере три отдельные пробы, различающиеся по объему в 10 раз.

Таблица 10.4. Рекомендуемые объемы проб для теста на ФКП методом мембранной фильтрации [3]

Водный источник	Объем, подлежащий фильтрации, мл						
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001
Озера, резервуары	×	×					
Колодцы, родники	×	×					
Водоразборные устройства		×	×	×			
Естественные купальные воды		×	×	×			
Промышленные стоки			×	×	×		
Сельскохозяйственные пруды, реки				×	×	×	
Ливневые воды					×	×	×
Необработанные сточные воды					×	×	×
Пищевые стоки					×	×	×

В случае когда испытания на ФКП проводятся методом мембранной фильтрации, используют специальную среду М-FC (ее состав см. в табл. 10.5), рекомендованную Американской ассоциацией здравоохранения [3]. Инкубационный период составляет 24 ч, и колонии ФКП подсчитываются под микроскопом для препарировальных работ, как описано в разд. 10.4. Окраска колоний ФКП голубая, тогда как колонии бактерий, связанных с другими источниками загрязнений, имеют окраску от серой до кремовой. Цвет фона на мембране будет варьировать от желтовато-кремового до слабо-голубого. Как и в случае испытаний на БГКП, оператор должен приобрести определенный опыт, чтобы быть уверенным в правильности подсчета. Подробно этот метод описывается в руководстве Американской ассоциации здравоохранения [3] и в руководстве под редакцией Борднера и др. [33].

Таблица 10.5. Состав питательной среды М-FC для подсчета ФКП

Компонент	Количество, г
Триптоза или биозат	10,0
Протеазный пептон № 3 или полипептон	5,0
Дрожжевой экстракт	3,0
Хлористый натрий	5,0
Лактоза	12,5
Желчные соли № 3 или смесь желчных солей	1,5
Анилиновый голубой	0,1

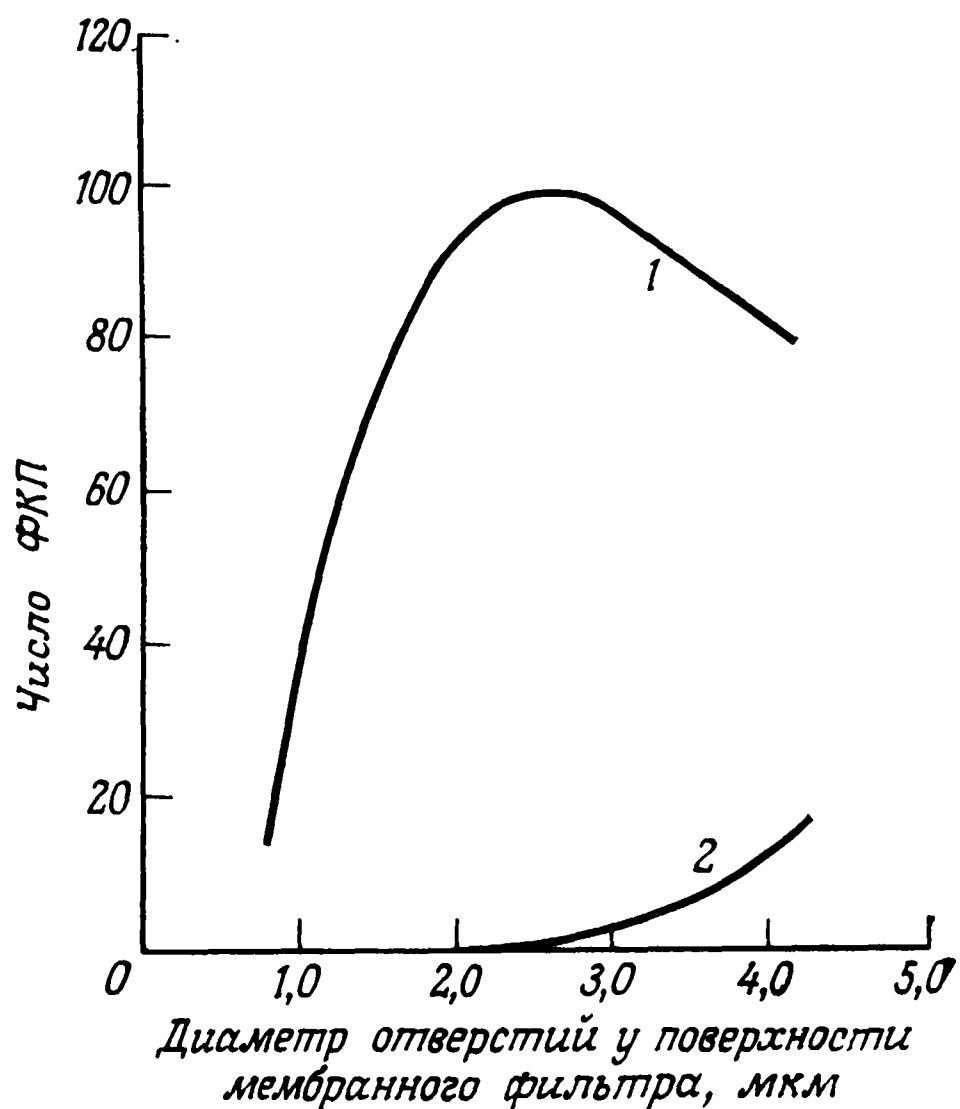
Компоненты даны из расчета на 1 л дистиллированной воды. Сухие компоненты растворяют в дистиллированной воде, содержащей 10 мл 1%-ной розоловой кислоты в 0,2 н. раствора NaOH. Розоловая кислота нужна, чтобы понизить фоновый счет колоний, которые не относятся к ФКП. При незначительном фоновом счете розоловую кислоту можно не добавлять. Подробности см. в руководстве [3].

10.6. МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ТЕСТЕ НА ФКП

Успешное применение мембранных фильтров в тесте на ФКП, как оказалось, существенно зависит от структуры пор самой мембраны. Поскольку эти испытания проводятся при повышенной температуре, микроорганизмы подвергаются значительному стрессу. При отборе контрольных проб возникает дополнительный источник стресса, обусловленный хлорированием воды. Кроме того, процент жизнеспособных БГКП определяется в значительной степени типом используемой мембраны.

На начальном этапе разработки теста на ФКП с помощью мембранной фильтрации для него применяли те же мембранные фильтры, что и для теста на БГКП. Затем Прессвуд и Браун [171] опубликовали сенсационную статью под названием «Сравнение мембранных фильтров производства фирм «Гелман» и «Миллипор» для подсчета ФКП». В ней было показано, что число ФКП на мембранах Гелман было в среднем на 53 % больше, чем на мембранах Миллипор. Как было установлено, оба типа мембран (мембраны Миллипор типа НА и мембраны Гелман типа GN-6) изготавливались из смешанных эфиров целлюлозы и имели номинальный размер пор 0,45 мкм. Поскольку фирмы-изготовители не раскрывали своих методов производства мембранных фильтров, прошло достаточно времени, прежде чем были обнаружены существенные различия между этими мембранами. В конце концов был созван симпозиум по проблеме селективного выделения ФКП на мембранных фильтрах [33]. Тем временем исследователи фирмы «Миллипор» [198] провели обширные испытания, чтобы определить оптимальную структуру мембранных фильтров для выделения ФКП. Они показали, что число ФКП резко увеличивается, если размеры пор мембраны на ее фильтрующей стороне больше, чем 0,45 мкм. На рис. 10.1 представлены данные из этой работы. Наблюдается заметное увеличение числа выделенных бактерий, когда диаметры отверстий пор на фильтрующей стороне составляют от 1,0 до 2,0 мкм, а затем при еще больших размерах отверстий у поверхности число ФКП уменьшается. Это уменьшение связано с плохим удерживанием бактерий в крупных порах на мембране; первоначальное же увеличение обусловлено другими факторами. Сладек и др. [198, 199] провели многочисленные испытания и показали, что ни химический состав мембраны, ни метод стерилизации не влияют на число выделяющихся бактерий. Таким образом, эффект уменьшения или увеличения числа выделившихся бактерий, по-видимому, определяется размером пор. Эти авторы сделали заключение, что оптимальное выделение ФКП происходит в том случае, когда бактерии отчасти соответствуют структуре отверстий на поверхности мембраны, так что они оказываются как бы в «колыбели» и, следовательно, в большей степени контактируют с питательными веществами. Было замечено, что необходимые для роста бактерий питательные вещества должны просачиваться вверх через мембрану под действием капиллярных сил, а из-за поверхностного испарения этих веществ плохой контакт с ними бактерий может вызвать локальные гипертонические условия, которые приводят к ее плазмолизу и гибели бактерий. Предположили, что это особенно сильно проявляется в случае микроорганизмов, подвергшихся стрессу. Все эти представле-

Рис. 10.1. Подсчет ФКП на анизотропных мембранных фильтрах с различными диаметрами отверстий у поверхности (1). Все подсчеты выполнены на основе анализа одной и той же пробы сточных вод. Чтобы оценить селективность мембраны для бактерий, определяли количество бактерий, прошедших сквозь нее (2); для этого фильтрат был вновь отфильтрован через обычную мембрану с порами 0,45 мкм. (Взято из работы [198].)



ния привели к разработке фирмой «Миллипор» нового мембранного фильтра, названного НС и имеющего более высокую степень анизотропности, чем обычный (рассмотрение анизотропии см. в разд. 2.3). Этот новый мембранный фильтр имеет размер отверстий у поверхности 2,4 мкм, а задерживающий размер пор 0,7 мкм, что дает значительно более высокий подсчет ФКП, чем обычная мембрана НА.

Мембраны НС выпускаются только диаметром 47 мм и применяются в большинстве работ, связанных с исследованием качества воды. Их продажная цена такая же, как и у мембран НА, но продаются они лишь в стерильных упаковках по 200 или по 1000 штук в каждой упаковке.

Согласно Грину и др. [94], Тобину и Дутке [222], а также Тобину и др. [223], мембраны Миллипор НС имеют лучшие характеристики для выделения ФКП, чем мембраны НА, но примерно эквивалентны обычным мембранам GN-6 фирмы «Гелман». (Однако Лемешов и Лицки [134] показали, что статистические методы подсчета, используемые Тобином и др. [223], не могли выявить отличия мембран Гелман от мембран Миллипор.) Было установлено, что как мембраны Гелман GN-6, так и мембраны Миллипор НС лучше, чем мембраны, выпускаемые некоторыми другими фирмами. В табл. 10.6 мы привели сводку данных, полученных Грином и др. [94]. Заметим, однако, что упомянутые там мембраны фирмы «Джонс-Мэнвилл» теперь производятся фирмой «Нуклепор» под маркой Мембра-

Фил¹, и нельзя гарантировать, что фирмы-изготовители все еще применяют те же производственные процессы, которые применялись в то время, когда выполнялась описываемая здесь работа.

Таблица 10.6. Сводка средних значений, полученных при подсчете колоний ФКП на мембранных фильтрах шести марок [94]

Число проб	Число чашек с мембранами	«Миллипор» НА	«Миллипор» НС	«Гелман»	«Шляйхер и Шуль»	«Сарториус»	«Джонс-Мэнвилл»	Статистически значимая разница *
6	30	37,5	51,5	49,5	31,3	38,3	41,2	3,6
30	150	30,2	40,9	37,3	26,1	33,2		1,6
53	265	30,3	40,7	37,4	26,1			1,2
64	320	31,2	41,8	38,5				1,1
17	85	29,9	45,6	43,2			38,0	2,1

* Значения в этом столбце дают статистически значимую разницу между двумя числами при 95%-ной достоверности.

Лоренц и др. [141] провели детальное сравнение мембранных фильтров семи марок, используя специальные статистические методы подсчета, чтобы ответить на некоторые вопросы, поднятые Лемешовом и Лицки в работе [134]. Были исследованы следующие мембраны: Миллипор НС, Миллипор НА, Сарториус 11106, Шляйхер и Шуль ВА85, Гелман GN-6, Оксид N47/45G и Пюропор PME-045-047-GMIN. Все эти мембраны имеют номинальный размер пор у верхней поверхности 0,45 мкм, а мембраны Миллипор НС и Пюропор специально производятся как анизотропные. Наблюдались заметные различия в выделении ФКП из речной воды на разных мембранах в зависимости от даты взятия пробы, но ни одна мембрана не давала постоянно высоких значений. Однако с помощью статистического метода подсчета под названием «многократное сравнение с наилучшим» удалось показать, что мембраны Миллипор НС и Пюропор были лучшими из всех проверенных, в то время как мембрана Миллипор НА была классифицирована как худшая. «Данные указывают на то, что ни одна мембрана не подходит идеально для подсчета ФКП в пробах речной воды... Данные, представленные в этой статье (имеется в виду статья [141].— Прим. перев.), не позволяют высказаться в поддержку какой-либо определенной мембраны. Мембраны Миллипор НС

¹ Мембраны сетчатого типа из смешанных эфиров целлюлозы.— Прим. ред.

и Пюропор могут классифицироваться как лучшие, но вследствие адсорбции на поверхности их пор поведение этих мембран при работе с водными пробами из разных источников не может быть точно предсказано». Лоренц и др. [141] изучали также различные мембраны под сканирующим электронным микроскопом, чтобы обнаружить, как определяются бактериальные колонии внутри мембранного фильтра. Однако они не нашли подтверждений гипотезы Сладека и др. [198] об «эффекте колыбели» (см. выше).

Американское общество по испытанию материалов (ASTM) опубликовало стандартный метод оценки мембранных фильтров для выделения ФКП (Стандарт D 3508), которым можно пользоваться в лабораториях, чтобы убедиться, что применяемые мембранные фильтры вполне пригодны для проведения испытаний на ФКП. Согласно этому стандарту, пять разных необработанных водных проб (четыре из загрязненных источников и одна из сточных вод) пропускают через мембранный материал, причем делают пять повторных операций для каждой пробы, а затем проводят инкубацию на агаре M-FC при температуре 44,5 °C. Одновременно пробы этой же воды инкубируют чашечным методом равномерного посева при тех же самых условиях. Сравнивая число подсчетов при повторных операциях, полученных методом мембранной фильтрации, с числом подсчетов в чашечном методе, можно определить степень выделения ФКП на испытываемых мембранных фильтрах. Согласно ASTM, этот метод испытаний особенно полезен для выбраковки тех мембран, которые не годятся для теста на ФКП. Этим стандартом следует пользоваться изготовителям мембранных фильтров для контроля качества их продукции; он применим также в программах по удостоверению качества мембранных фильтров. Однако до сих пор изготовители мембранных фильтров не указывают в своей технической документации, что их мембраны были подвергнуты испытаниям на соответствие Стандарту D 3508 ASTM, и не приводят данных, касающихся эффективности их мембранных фильтров по выделению ФКП в соответствующих испытаниях.

10.7. ФЕКАЛЬНЫЕ СТРЕПТОКОККИ

Фекальные стрептококки (ФС) представляют группу бактерий рода *Streptococcus*, которые обычно обитают в кишечном тракте теплокровных животных. В естественных условиях ФС не выживают в течение столь длительного времени, как ФКП; поэтому их регистрация в отчетах по загрязнению воды полезна в первую очередь при обнаружении фекального загряз-

нения, произошедшего *только что* или *недавно*. Сточные воды фабрик, производящих пищевые продукты, боен, консервных и сыроваренных заводов, так же как пищевые и сельскохозяйственные стоки, можно успешно анализировать на ФС методом мембранной фильтрации. Некоторые представители группы ФС связаны с растительностью, насекомыми и определенными почвами, так что их прямое отношение к фекальному загрязнению не столь очевидно, как в случае группы ФКП.

Для количественного определения ФС были освоены как метод НВЧ, так и метод мембранной фильтрации. Оба метода основаны на том, что рост ФС не ингибируется азидом натрия, ингибитором аэробного роста БГКП и большинства обычных почвенных и водных бактерий.

Метод мембранной фильтрации подробно рассматривают Бодуэн и Лицки [21]. Применяемая среда (стрептококковый KF-агар, табл. 10.7) содержит мальтозу и лактозу в качестве ферментативно расщепляемых сахаров и хлорид 2,3,5-трифенилтетразолия как индикатор окислительно-восстановительных процессов, а также азид натрия для ингибирования других микроорганизмов. На мембранных фильтрах, помещенных на эту среду, колонии ФС имеют окраску от темно-красной до розовой.

Таблица 10.7. Состав стрептококкового KF-агара

Компонент	Содержание, г
Протеазный пептон № 3 или полипептон	10,0
Дрожжевой экстракт	10,0
Хлорид натрия	5,0
Глицерофосфат натрия	10,0
Мальтоза	20,0
Лактоза	1,0
Азид натрия	0,4
Агар	20,0

Компоненты даны из расчета на 1 л дистиллированной воды. За подробностями читатель может обратиться к руководству [3].

Количество воды, которое надо отфильтровать при отборе проб на анализ, колеблется от 0,01 до 100 мл в зависимости от того, насколько загрязнена водная проба. Примерным руководством для определения величины пробы может служить табл. 10.2. Инкубацию проводят при температуре 35 °С и через 48 ч подсчитывают колонии на мембранах под бинокулярным микроскопом для препарировальных работ с 10—15-кратным увеличением. В связи с тем что питательная среда для ФС

имеет повышенную селективность, рекомендуется, чтобы число колоний ФС было равно 20—100 на мембрану, т. е. больше, чем при подсчете БГКП, когда требуется 20—80 колоний. Используют мембраны с размером пор 0,45 мкм, причем в отличие от результатов, полученных с ФКП, здесь не обнаружено значительной разницы ни для различных типов мембран, ни для мембран, изготовленных разными изготовителями [21].

На начальной стадии изучения с целью проведения операции подтверждения характерные колонии следует перенести на сердечно-мозговой агар и проверить на наличие каталазы (которая должна отсутствовать в ФС) добавлением нескольких капель 3 %-ной перекиси водорода. Выделение пузырьков свидетельствует о наличии каталазы, а это в свою очередь означает, что в пробе присутствуют нестрептококковые микроорганизмы. Если проверка на каталазу дает отрицательный результат, то наличие стрептококка можно затем выявить по его способности расти при температуре 45 °С и в присутствии желчных солей.

В некоторых случаях может оказаться желательной дополнительная характеристика отдельных видов ФС. Уточнение вида может быть особенно ценным, если необходимо отличить те стрептококки, которые обычно больше связаны с теплокровными животными [например, *Streptococcus bovis* (крупный рогатый скот) или *Streptococcus equinus* (лошадь)], от видов, связанных с человеком (например, *S. fecalis* и *S. faecium*). Подробности см. в руководстве [3], а также в книге Борднера и др. [33]. Даубнер и Петер [57] представили обзор литературы по разработке и обоснованию теста на ФС методом мембранной фильтрации.

Согласно руководству [3], тест на ФС можно использовать для проверки пресных и соленых вод, но он не подходит для вод большой мутности, а также для хлорированных стоков.

10.8. SALMONELLA И SHIGELLA

Представители родов *Salmonella* и *Shigella* не являются бактериями-индикаторами, а известны как кишечные болезнетворные организмы. Содержание их как в кишечном тракте, так и в загрязненной воде всегда существенно ниже, чем содержание БГКП или ФС, вследствие чего метод прямого счета невозможен. Общая процедура заключается в том, чтобы с помощью соответствующего способа сконцентрировать бактерии из большой водной пробы, а затем создать им оптимальные условия для роста с помощью подходящей селективной питательной среды. После такого обогащения патогенный микроор-

ганизм может быть выделен штриховой разводкой на другой селективной среде и последовательно идентифицирован стандартными бактериологическими методами.

Мембранная фильтрация представляет собой один из способов концентрирования *Salmonella* и *Shigella* из воды или сточных вод. Водная проба, обычно 1—2 л, пропускается под давлением через мембранный фильтр диаметром 142 мм с размером пор 0,45 мкм. Затем мембрану в стерильных условиях разрезают на части, которые добавляют в порции селективного бульона для обогащения и селекции требуемой бактерии. Мембранную фильтрацию имеет смысл проводить для воды с малой мутностью и с низким содержанием органических веществ, когда не происходит забивания мембраны. Если же оно происходит, то следует предварительно отфильтровать пробу через фильтр из стекловолокна с номинальным размером пор 1—2 мкм. Если же и это не помогает, то от мембранной фильтрации следует отказаться и вместо нее использовать фильтрацию через диатомовую землю [3]. Применение мембранной фильтрации более предпочтительно потому, что при этом задерживаются любые клетки, содержащиеся в водной пробе, но метод с использованием диатомовой земли, хотя он и не является количественным, менее чувствителен к забиванию.

Для фильтрации очень больших объемов Борднер и др. [33] рекомендуют применять патронные фильтры. Этот метод, который впервые использовали Левин и др. [138], предусматривает применение патронного фильтра фирмы «Болстон» типа AAQ (2,5×6,4 см) в сочетании с фильтродержателем Болстон 90. Фильтр выполнен из волокон боросиликатного стекла, связанных эпоксидной смолой. Установлено, что эффективность задержки частиц размером 0,3 мкм для водных систем равна 98 %. Максимально рекомендуемая разность давлений при использовании вакуумной фильтрации составляет 0,7 атм (69 кН/м²). Если использовать корпус типа Болстон 95Р, то давление можно повысить до 7 атм (690 кН/м²). По окончании фильтрации патрон извлекают в стерильных условиях и помещают непосредственно в соответствующую питательную среду для инкубации. Такая система позволяет фильтровать 20 и более литров воды, так что этот метод применим к воде с низким содержанием патогенных организмов. Однако на фильтрацию 10 л воды средней мутности идет около 1 ч. Если фильтрацию требуемого объема воды нельзя осуществить из-за большой мутности через один фильтр-патрон, то можно с успехом использовать несколько таких устройств, которые затем помещают в один и тот же контейнер с культурой. Подробности этого метода фильтрации см. в работе [138] и в технической документации фирмы «Болстон».

Блок и Ролланд [32] с целью увеличения скорости фильтрации модифицировали метод Левина и др. Они применили трубчатые фильтр-элементы фирмы «Болстон» типа С длиной 63 мм с эффективностью задержки частиц размером 8 мкм, составляющей 98 %. Эти фильтры использовались с пластмассовым фильтродержателем Болстон 52-12-2. При таких больших размерах пор скорость фильтрации была высокой, но большинство бактерий не задерживалось. Чтобы улучшить задержание, рН водной пробы понижали до 3,5, так что знак заряда поверхности бактериальных клеток был изменен на противоположный (см. обсуждение эффектов заряда в разд. 12.5). После быстрой фильтрации воду пускали через фильтр в обратном направлении, и бактерии вымывались 3 %-ным мясным экстрактом при рН 9,5 (при таком высоком значении рН знак заряда бактерий становится прежним, что способствует более легкому освобождению клеток). Контрольные опыты показали, что *Salmonella typhimurium* в процессе обработки как при рН 3,5, так и при рН 9,5 за время более чем 30 мин существенно не инактивировалась. При использовании этой системы полное выделение бактерий *Salmonella*, добавленных к водным пробам в известных количествах, варьировало от 4 до 87 % в зависимости от водной пробы.

Гойал и Герба [90] пытались улучшить метод Блока и Ролланда [32], используя электроположительные фильтры Дзета-Плюс производства фирмы «АМФ Кюно» (об этих фильтрах см. в разд. 12.5). Поскольку поверхность пор фильтров Дзета-Плюс заряжена положительно, а поверхность бактерии при нейтральных значениях рН несет отрицательный заряд, потенциально вредная стадия подкисления, использованная Блоком и Ролландом, не является необходимой. Было показано [90], что 99,4 % бактерий *Escherichia coli* при рН 7,5 адсорбировалось на фильтре Дзета-Плюс 30S. Десорбцию вели пропусканием через фильтр в обратном направлении 3 %-ного мясного экстракта при рН 10,0 или триптиказно-соевого бульона при рН 7,5. Однако даже в этих самых лучших условиях десорбция бактерий с фильтров была неполной (менее 44 %).

Согласно Даубнеру и Петеру [57], прямое выделение колоний *Salmonella* без предварительного обогащения можно осуществить и на мембранных фильтрах, если использовать одну из многих дифференциальных и селективных сред для *Salmonella*, такую, как агар Вильсона — Блэра. Авторы упомянутой работы сообщили о прямой фильтрации речной воды Дуная через мембранные фильтры с последующим успешным культивированием колоний; при этом содержание *Salmonella* достигало порядка 1000—3000 на литр. При таких концентрациях мембранную фильтрацию можно использовать в известной

степени как количественный метод точно так же, как и в случае подсчетов ФКП. Однако столь высокое содержание *Salmonella* в водах Дуная совершенно нетипично, а для большинства анализируемых вод прямой метод ранней фильтрации неприменим.

10.9. ДРУГИЕ БАКТЕРИИ

Метод мембранной фильтрации разрабатывался также для ряда других патогенных или индикаторных бактерий, которые могут находиться в воде. Данный раздел мы посвятим краткому их обсуждению.

Leptospira. Бактерии рода *Leptospira* — это спирохеты, которые патогенны для диких и домашних животных, а иногда становятся патогенными и для человека. Они наиболее часто находятся в прибрежных отложениях на дне рек и прудов. Водные пробы с обильным осадком, полученные из соответствующих мест, необходимо интенсивно потрясти, чтобы высвободить бактерии из осевших частиц, а затем пропустить через фильтровальную бумагу или через пористую подложку мембранного фильтра. Отфильтрованную таким образом пробу снова подвергают фильтрации через двойной фильтр, состоящий из стекловолоконного предфильтра и мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм. Бактерии *Leptospira*, будучи тонкими и гибкими, могут пройти через поры 0,45 мкм, в то время как другие микроорганизмы, присутствующие в пробе, не могут. Удобнее всего проводить фильтрацию, используя шприц-насадки (см. рис. 7.4) и собирая фильтрат в стерильную пробирку. После промывки этой фильтрационной системы стерильной водой объединённые фильтраты вводят (инокулируют) в питательную среду, благоприятную для роста *Leptospira* (см. [3, 57]). Для инокуляции следует брать 1,0 и 0,1 мл фильтрата. Раз в неделю пробирки с культурой необходимо проверять на рост *Leptospira* под микроскопом с темнопольным освещением. Если *Leptospira* не обнаруживаются в течение 6 недель, то тест считается отрицательным.

Staphylococcus. Поскольку *Staphylococcus* связан с дыхательным трактом и кожей, было предложено использовать тест на этот микроорганизм в местах массового купания (плавательные бассейны, пляжи на озерах и морских берегах) для определения степени загрязнения этих вод человеком. Разработанный для этого метод мембранной фильтрации включает фильтрацию проб воды (воды в местах массового купания, как правило, не слишком замутнены, так что забивания мембран не происходит) объемом 10 и 100 мл через мембраны с порами

0,45 мкм, после чего эти мембраны помещают на чашки с агаром Чапмэна — Стоуна, который является селективной средой для стафилококка [3]. Вообще говоря, единственные колонии, которые растут на этой высокосолевого среде, — это колонии стафилококка, так что детального подтверждения не требуется, хотя сомнительные колонии могут быть верифицированы микроскопически с красителем по Граму.

Pseudomonas. Вредный болезнетворный микроорганизм *Pseudomonas aeruginosa* иногда переносится водой [104], и для его обнаружения существуют методы мембранной фильтрации [57, 65, 137]. Даубнер и Петер [57] для начального выращивания псевдомонад после фильтрации пробы использовали агар Эндо. Мембрану инкубируют при температуре 37 °С в течение 24 ч и затем переносят на фильтровальную бумагу, насыщенную реагентами, которые используют в оксидажном тесте. Положительные колонии, которые становятся голубыми в течение 1—2 мин, почти всегда и есть псевдомонады. Даубнер и Петер дают также описание метода, при котором водная проба с помощью барботирования воздухом, кислородом или азотом интенсивно перемешивается в течение 14—21 сут. За это время большинство бактерий в водной пробе погибает, но представители рода *Pseudomonas* размножаются и постепенно становятся преобладающими микроорганизмами.

Для выращивания на мембранных фильтрах *Pseudomonas aeruginosa* используется селективная среда другого рода (обозначенная как mРА), описанная Левином и Кабелли [137]; при этом для ингибирования остальных бактерий в нее входят следующие антимикробные агенты: сульфамиридин, канамицин, налидиксиновая кислота и циклогексимид. Эта среда содержит также индикаторные системы, чтобы отличить бактерии-потребители лактозы, сахарозы и ксилозы от производителей сероводорода, причем ни один из этих микроорганизмов не является псевдомонадой. Инкубация ведется при температуре 41,5 °С в течение 48 ч. Плоские колонии диаметром 0,8—2,2 мм, имеющие светлые внешние края и окраску в центре от коричневого до зеленовато-черного, являются *Pseudomonas aeruginosa*. Более детальное рассмотрение, касающееся вопросов обнаружения и роли этих бактерий в воде, дается в работе [104].

Другие микроорганизмы. Методы мембранной фильтрации разработаны также для следующих микроорганизмов: *Vibrio parahaemolyticus* [50, 51], *Aeromonas* [51], *Vibrio cholera*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Bacillus anthracis* [57], *Clostridium perfringens* [29, 57, 77], для бифидобактерий [135, 136, 175], для дрожжевой *Candida albicans* [41, 196] и *Versinia enterocolitica* [20, 103].

10.10. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной главе мы рассмотрели конкретные методы анализа воды на присутствие в ней индикаторных и некоторых патогенных микроорганизмов. Изложенный в ней материал является обобщением основных положений гл. 9, посвященной подсчету жизнеспособных микроорганизмов, но содержит более детальные сведения об отдельных микробных группах, обнаружение которых играет важную роль для контроля загрязнения воды. Выбор подходящего мембранного фильтра представляет собой существенный фактор для микробиологического анализа воды по трем причинам.

1. Микроорганизмы, которые надлежит выделить из воды, зачастую повреждены из-за ее хлорирования или других видов стресса.

2. Питательные среды, применяемые при анализе водного загрязнения, часто содержат ингибиторы, предназначенные для предотвращения роста нежелательных бактерий, и эти ингибиторы не всегда достаточно избирательны, вследствие чего исследуемый микроорганизм может также подвергнуться частичному ингибированию.

3. Из-за неравномерного высыхания верхней стороны мембраны рост бактерий на поверхности мембранного фильтра сам по себе создает стрессовую ситуацию.

Было показано, что оптимальная структура мембранного фильтра — это та, при которой микроорганизмы удерживаются не только на поверхности мембраны, но имеют возможность проникать в поры на небольшое расстояние. Была высказана гипотеза, состоящая в том, что микроорганизмы, захваченные при этом в матрицу мембраны, оказываются заключенными в «колыбель», которая избавляет их от некоторых возможных видов стресса.

Метод мембранной фильтрации позволил провести количественный анализ большого набора микроорганизмов, но только микроорганизмы, относящиеся к БГКП, были подвергнуты всеобъемлющим испытаниям. Для анализа этих микроорганизмов широко используются два метода: тест на содержание БГКП и тест на содержание ФКП. Оба этих метода имеют юридическую силу в предписаниях, относящихся к водным источникам. Именно тесты на БГКП привели к началу промышленного производства мембранных фильтров. В настоящее время они нашли самые разнообразные применения, но все же важнейшим из них остается их использование в анализе загрязнения воды.

Глава 11

Применение мембранных фильтров для биомедицинских и аналитических целей

11.1. ВВЕДЕНИЕ

В гл. 8—10 мы уже обсудили использование мембранных фильтров для некоторых биомедицинских целей и при охране окружающей среды. В этих главах речь шла о применении мембранных фильтров для подсчета жизнеспособных микроорганизмов, для их прямой микроскопии, а также в работах по анализу загрязнения воды. Существует также ряд других направлений, в которых мембранные фильтры используют в лаборатории, главным образом в биомедицинских исследованиях. Цель настоящей главы состоит в том, чтобы обсудить некоторые основные применения мембранных фильтров в биомедицинских исследованиях и анализе.

11.2. ЯЧЕЙКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Мембранные фильтры широко применяются в конструкциях небольших ячеек для культивирования клеток. Такие ячейки предназначены, как правило, для изучения действия факторов окружающей среды на популяцию клеток, обычно чистых культур, которые высеяны внутри ячейки. Во многих конструкциях ячеек использовались мембраны для ультрафильтрации или диализа (см. [230]), но микрофильтрационные мембраны намного лучше, поскольку они обеспечивают значительно более быструю диффузию питательных веществ и продуктов метаболизма клеток.

В зависимости от назначения можно конструировать ячейки самых разных типов. Главная идея состоит в том, чтобы диффузионная ячейка была изготовлена из инертного материала (плексигласа, поликарбоната) и включала в себя два мембранных фильтра, разделенных между собой достаточно большим просветом, необходимым для роста культуры клеток. Края мембранных фильтров должны быть хорошо загерметизированы, чтобы предотвратить подтекание растворов, но в то же время

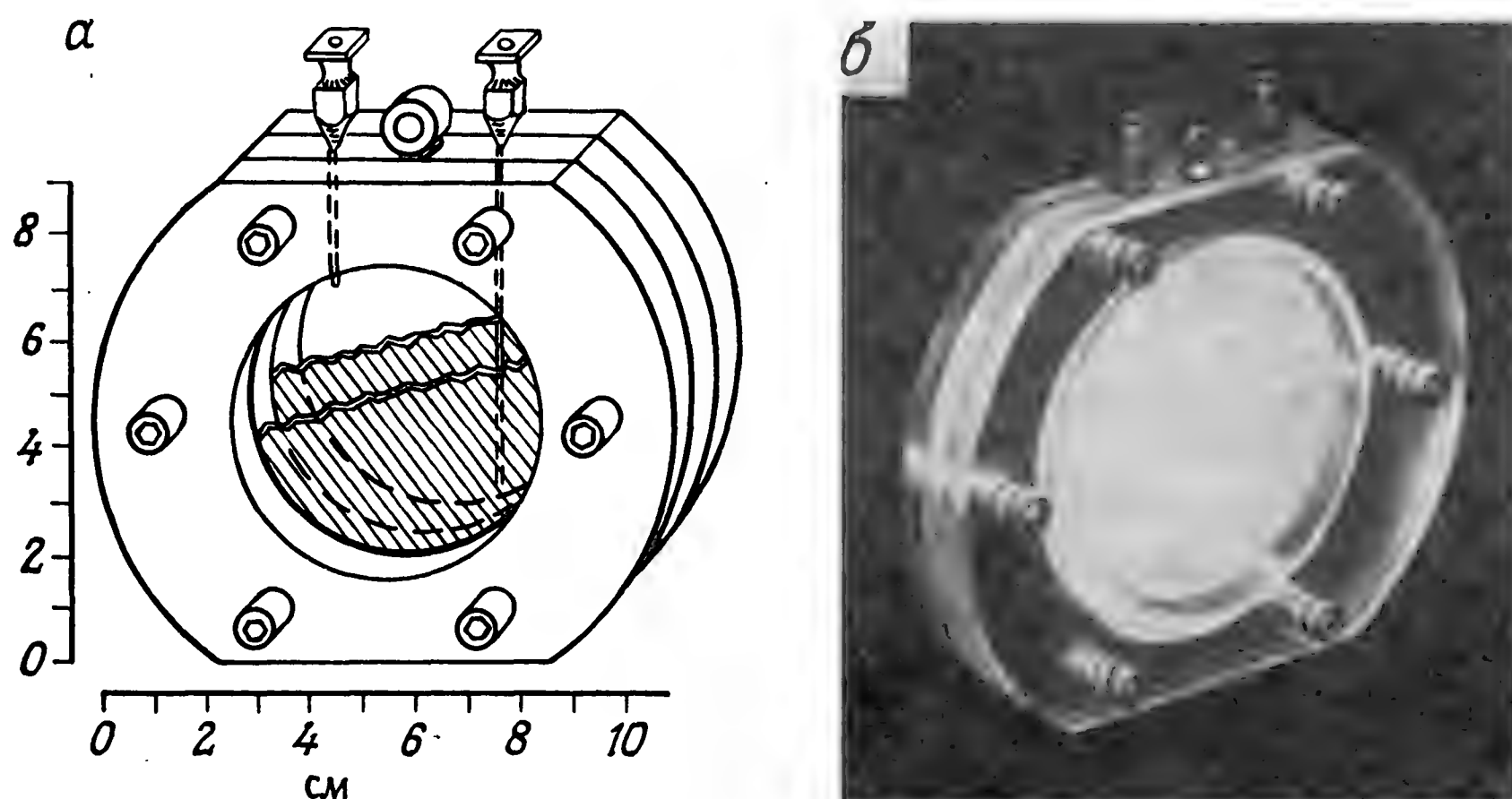


Рис. 11.1. Ячейка для культивирования, содержащая диализную мембрану для изучения загрязненности воды. *а* — схематическое изображение (из работы [149]); *б* — фото ячейки (любезно предоставлено Г. Мак-Фетерсом, Государственный университет Монтаны, США).

отбор проб и демонтаж устройства не должны вызывать затруднений.

Мак-Фетерс и Стюарт [149] описали устройство ячейки, предназначенной для анализов загрязнения воды. Она изготавливается фирмой «Вэлли мэшин энд инжиниринг компани». Конструкция этой ячейки и показана на рис. 11.1. Она предназначена для 20 мл пробы и снабжена двумя отверстиями, куда вставляются две иглы 18-го калибра для подкожных инъекций; одна — для введения веществ сверху, другая — для удаления их из середины ячейки. Стенки ячейки из термостойкого полимера стерилизуются отдельно в автоклаве, а мембранные фильтры стерилизуются с помощью ультрафиолетового облучения. Мак-Фетерс и Стюарт использовали микрофльтрационные мембраны НАWP фирмы «Миллипор» (белого цвета с размером пор 0,45 мкм), имеющие вид дисков диаметром 7,5 см. Перед сборкой мембранные фильтры замачивали в течение 15 мин в стерильном буфере, чтобы сделать их более гибкими, после чего прибор собирался в стерильных условиях. Следует заметить, что в ячейке для культивирования можно использовать также и ультрафильтрационные мембраны.

Мак-Фетерс и Стюарт измерили такой важный параметр, характеризующий ячейку, как скорость установления в ней равновесия растворенных веществ. Как показано на рис. 11.2, при использовании микрофльтрационных мембран равновесие рас-

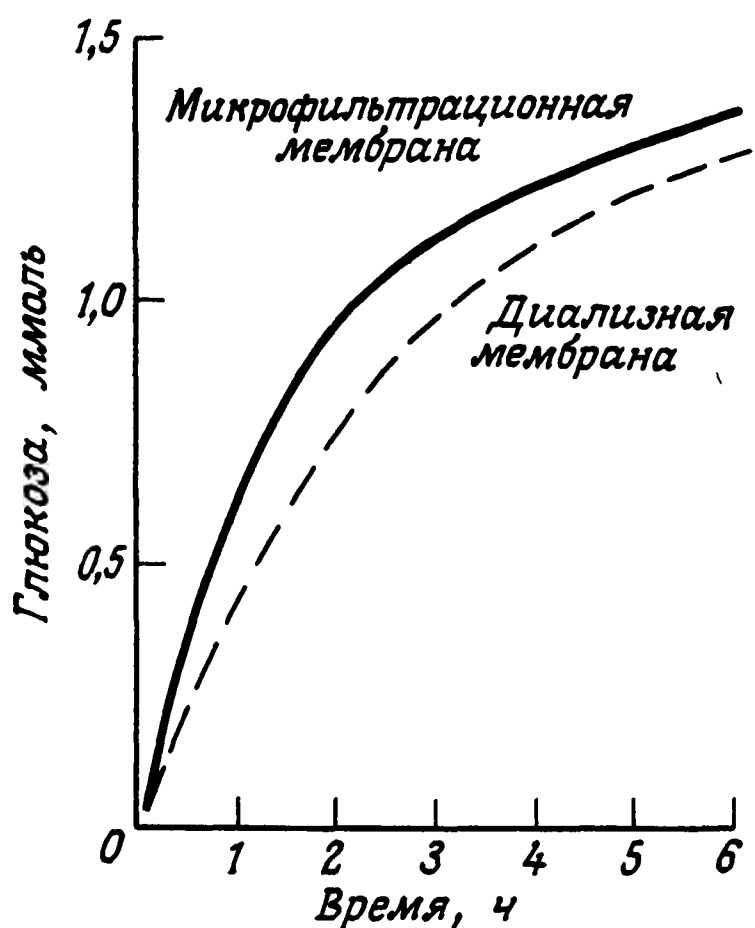


Рис. 11.2. Скорость поступления глюкозы через микрофильтр и диализную мембрану в ячейку для культивирования. Размер пор микрофильтра 0,45 мкм. Диализная мембрана представляла собой обычную диализную трубку [149].

творенных веществ устанавливалось быстрее, чем при использовании диализных мембран (последние были использованы в виде диализных трубок), но в любом случае равновесие устанавливалось за несколько часов. Такое медленное наступление равновесия, находящееся в зависимости от скорости поглощения растворенных веществ микроорганизмами внутри ячейки, может быть нежелательно. Заметим, что, поскольку в этой ячейке не предусмотрено перемешивание содержимого, существует реальная возможность образования застойной зоны с обедненной концентрацией растворенного вещества.

Васконселос и Шварц [230] описали модифицированную ячейку для культивирования, в которой более быстро устанавливается равновесие. Они ввели два существенных изменения, а именно перемешивание пробы внутри ячейки и использование вместо мембран фирмы «Миллипор» мембран Нуклепор. Хотя у мембран Нуклепор плотность пор намного меньше, чем у целлюлозных мембран, они значительно тоньше и поэтому обеспечивают существенно более быстрое установление равновесия. Сама ячейка изготовлена из поликарбоната и может быть собрана из стандартного оборудования, выпускаемого фирмой «Миллипор». Она снабжена магнитной мешалкой, которая работает от батареи, герметизирована и может поэтому функционировать в воде (рис. 11.3). Электрическая батарея обеспечивает работу небольшого моторчика (6 вольт, 200 об/мин) в течение 7 сут без существенной потери мощности. Более высокая скорость установления равновесия в ячейках с мембранами Нуклепор и преимущества перемешивания иллюстрируются на рис. 11.4, который показывает скорость, с которой флюоресцеиновый краситель выводится из ячейки. Время, необходимое для 90—

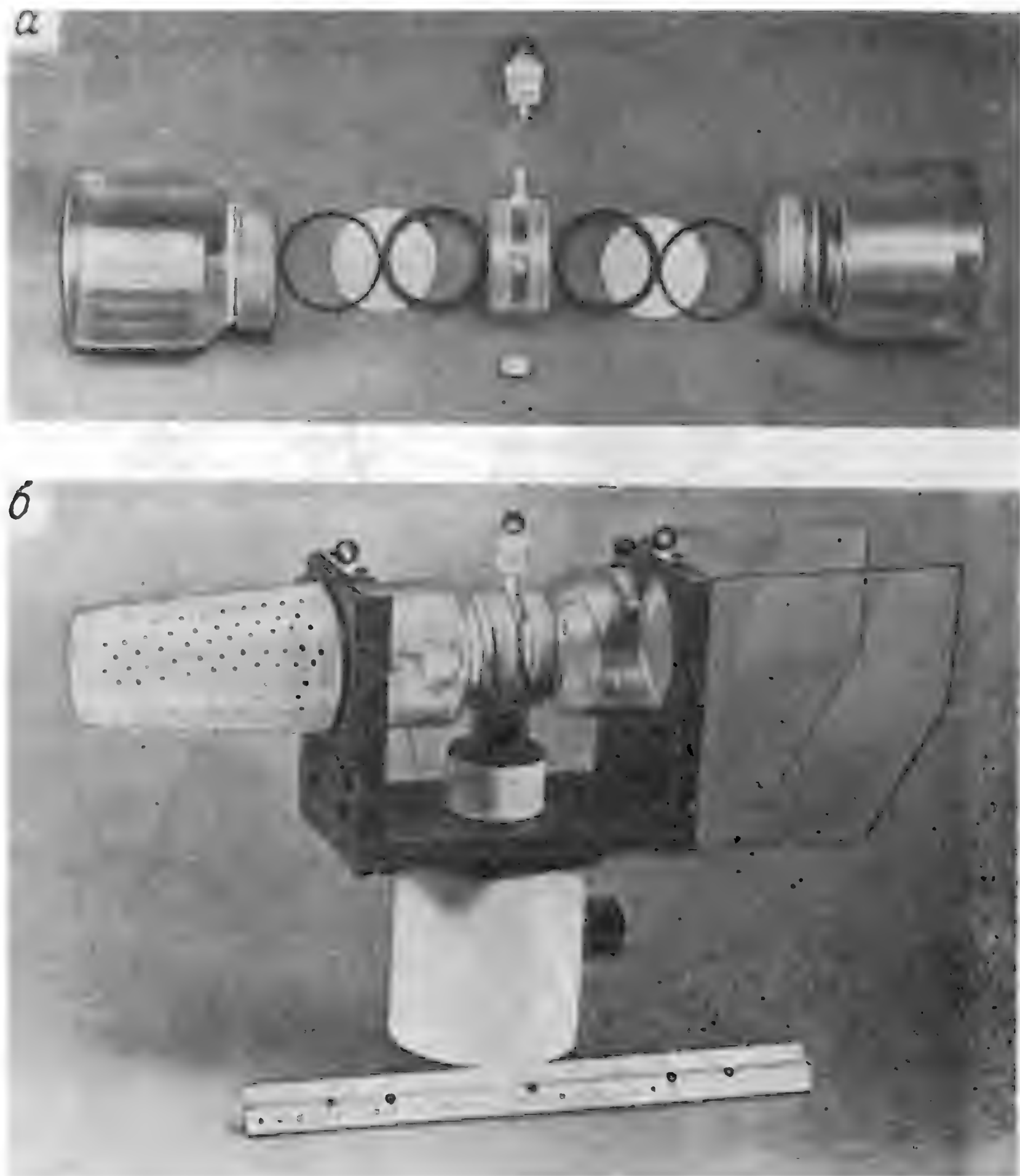


Рис. 11.3. Ячейка с перемешиванием для культивирования клеток. *а* — разобранная ячейка; слева направо: фильтровальная воронка (Миллипор), круглое кольцо, мембрана, круглое кольцо, снаряженная центральная камера, круглое кольцо, мембрана, круглое кольцо, фильтровальная воронка; над снаряженной ячейкой расположена шприц-насадка Суиннекс, через которую отбирают пробу; магнитный перемешивающий стержень установлен внутри ячейки; *б* — аппарат в собранном виде; видна герметизированная магнитная мешалка с мотором, работающим от батареи; расположенные справа: пластины из плексигласа и носовой конус слева служат для того, чтобы направлять поток жидкости, стабилизировать ячейку и предохранять боковые стенки мембран. (Неопубликованные фото любезно предоставил Дж. Васконселос.)

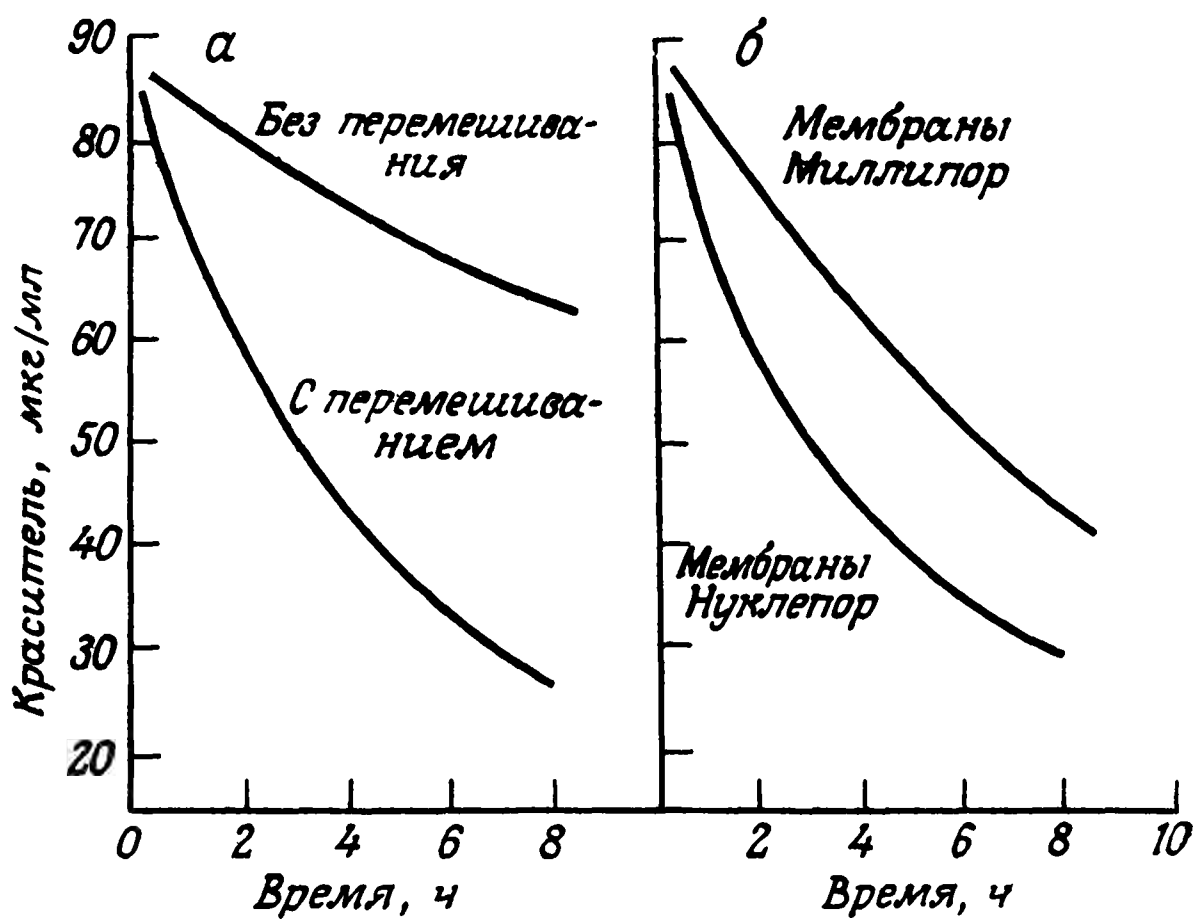


Рис. 11.4. Влияние перемешивания на скорость прохождения флюоресцеинового красителя через мембраны Миллипор и трековые мембраны Нуклепор. *а* — мембраны Нуклепор с перемешиванием и без перемешивания; *б* — мембраны Нуклепор и Миллипор с перемешиванием. (Взято из работы [230].)

99 %-ного замещения растворенного вещества, может быть вычислено из кинетических данных (см. табл. 11.1). Даже с мембранами Нуклепор при перемешивании требуются почти сутки для установления полного равновесия, а кинетические особенности процесса разбавления таковы, что установление полного равновесия в ячейке займет еще больше времени (теоретически не наступит никогда, поскольку этот процесс описывается асимптотической функцией). Так или иначе, это медленное установление равновесия будет зависеть в конкретном случае от плотности популяции внутри ячейки и скорости, с которой растворенные вещества поглощаются клетками.

Трудности вызывает не только низкая скорость установления равновесия, но и загрязнение поверхности мембран; последнее

Таблица 11.1. Время (в часах), необходимое для замещения относительного объема (в процентах) диффузионной ячейки [230]

Мембрана (условия проведения опыта)	Глюкоза			Флюоресцеин		
	99 %	95 %	90 %	99 %	95 %	90 %
Миллипор (с перемешиванием)	54,0	36,0	27,5	45,0	30,0	23,0
Миллипор (без перемешивания)	54,0	36,0	27,5	66,0	44,0	33,0
Нуклепор (с перемешиванием)	28,5	19,0	9,5	29,0	19,0	14,5
Нуклепор (без перемешивания)	35,0	23,5	17,5	95,0	64,0	48,0

может происходить при длительном использовании таких ячеек как в лабораторных, так и в полевых условиях. Загрязнение поверхности мембран особенно существенно, если ячейки работают на открытом воздухе, хотя в зависимости от характера эксперимента это может происходить и в лабораторных условиях. Органические вещества, бактерии и другие материалы могут легко адсорбироваться мембранными фильтрами и изменять их поверхность столь существенно, что ячейка для культивирования перестает работать, как положено. В сущности микроорганизмы, способные подвергать биodeградации матрицу мембраны (например, бактерии, разлагающие целлюлозу), могут образовывать колонии на внешней стороне мембраны и изменять характеристики ее проницаемости настолько, что она перестает функционировать должным образом. Наконец, небольшие подвижные микроорганизмы, такие, как спирохеты [46], могут проникать через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм. Хотя спирохеты, по-видимому, не могут пройти через мембраны с порами 0,22 мкм, скорость установления равновесия при работе с мембранами со столь небольшими порами будет еще меньше по сравнению с той, которую мы рассмотрели выше, так что использование таких мембран будет малоэффективным.

Из вышесказанного очевидно, что ячейки для культивирования этого типа будут работать должным образом лишь в том случае, если плотность популяции микроорганизмов внутри камеры невелика, и только при коротких периодах инкубации. Работа Мак-Фетерса и Стюарта [149] по выживанию ФКП в естественных водах была проведена с низкими плотностями популяции этих бактерий, и продолжительность опытов не превышала нескольких дней, так что использование подобных ячеек было оправдано. Другие области применения ячеек для культивирования в микробиологических исследованиях окружающей среды рассматривали Куницка-Голдфингер [130], Куницка-Голдфингер и Стронковска [131], а также Мейер-Рейл [151]. Ван Эк [229] описал использование ячеек с мембранами Нуклепор для изучения процесса интродукции микроскопических грибов в почву с последующим анализом под электронным микроскопом. Репортер [174] привел описание ячейки с мембранными фильтрами для изучения взаимодействия между корневыми клетками растений и бактериями вида *Rhizobium japonicum*.

11.3. ХЕМОТАКСИС И МИГРАЦИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ

Ячейки для культивирования, содержащие мембранные фильтры, могут быть использованы для изучения реакции клеток млекопитающих на хемотаксисное раздражение. Такие

виды лейкоцитов, как нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, моноциты и лимфоциты, способны мигрировать по направлению к хемотаксисным раздражителям [201]. Главными аттрактантами лейкоцитов в живом организме являются белковые комплексы (названные «хемотаксисными факторами» или «хемотаксисными пептидами»), которые освобождаются во время расщепления комплемента. Бактерии также могут служить источником хемотаксисных факторов, либо продуцируя их непосредственно, либо через взаимодействие с комплементом.

Применение хемотаксисного анализа в клинической практике основано на том, что некоторые лейкоцитарные заболевания могут быть вызваны аномалиями в лейкоцитах, что обнаруживается по пониженной хемотаксисной реакции. Лейкоцитарные заболевания часто обнаруживают у пациентов, которые страдают от хронических, рецидивных бактериальных инфекций. Лейкоцитарное заболевание может быть либо врожденным, либо следствием некоторых других болезней, например диабета.

Ячейка, используемая для хемотаксисного анализа, много меньше, чем описанная выше для исследования окружающей среды. Она представляет собой стальную или пластмассовую емкость с одним мембранным фильтром, разделяющим ее на два отделения: одно содержит клетки, другое — хемотаксисные факторы. Объем каждого отделения примерно 1 мл.

Хемотаксисные ячейки поставляют несколько фирм. Фирма «Шляйхер и Шуль» выпускает ячейки из нержавеющей стали под мембрану диаметром 25 мм и прозрачную акриловую камеру под мембрану диаметром 13 мм. Эта фирма выпускает также мембранные фильтры из нитроцеллюлозы, обозначенные ЛК, у которых рабочая сторона является в упаковке нижней. Эти мембраны выпускаются с размерами пор 1,2; 3,0; 5,0; 8,0 и 12,0 мкм. Мигрирующие клетки более эффективно прилипают к рабочей стороне мембраны.

Фирма «Нуклепор» выпускает обширный набор оборудования для хемотаксисного анализа, включающий комплект прозрачных акриловых камер, которые могут быть собраны без круглых колец, под мембраны диаметром 13 мм. Эта компания продает также набор для хемотаксисного анализа Chemotaxis Starter Kit, который содержит 12 ячеек, стойку для их крепления, автоматическую микропипетку и мембраны Нуклепор с порами размером 5 мкм. Этот размер рекомендован для изучения моноцитов, макрофагов и базофилов, в то время как поры размером 2 или 3 мкм подходят для изучения полиморфонуклеарных лейкоцитов. Для изучения лейкоцитов фирма «ADAPS, Inc.» продает ячейки одноразового использования под мембраны диаметром 13 мм.

Хемотаксисный анализ подробно описывает Уорд в работе [233]. Подлежащие исследованию лейкоциты получают обычной клинической процедурой и суспендируют в тканевой культуральной среде до концентрации $2,5 \cdot 10^6$ клеток/мл, после чего добавляют 10 %-ную нормальную сыворотку. Можно использовать несколько источников хемотаксисных факторов, из которых рекомендуются культуральный супернатант бактерий *E. coli* и фрагмент С5 комплемента, генерируемого добавлением зимо-зана к свежей человеческой сыворотке. Нижняя камера ячейки заполняется 1 мл жидкости, содержащей хемотаксисный фактор, а 1 мл клеточной суспензии аккуратно вносят в верхнюю камеру. Ячейку инкубируют при температуре 37 °С в течение 3 ч, после чего ее разбирают, а мембраны извлекают для проверки. Мембраны погружают в абсолютный пропанол, чтобы зафиксировать клетки, которые затем окрашивают в течение 15 минут в гемотоксилине, промывают водой, обезвоживают этанолом и абсолютным пропанолом и, наконец, освещают ксилолом. (Окрашивание проводится так же, как и при эксфолиативных цитологических процедурах; см. разд. 8.10). Затем мембраны после осветления помещают на предметные стекла с заливочной средой таким образом, чтобы поверхность, обращенная ранее к клеткам, теперь была направлена вниз. Это дает возможность легче обнаружить клетки, которые переместились через поры мембраны во время хемотаксиса. Поверхность мембраны, которая вначале была верхней, будет содержать лимфоциты и моноциты, не прореагировавшие на хемотаксисное раздражение, а первоначально нижняя поверхность будет содержать лишь проникшие через мембрану нейтрофилы. Под микроскопом при максимальном увеличении без иммерсионного масла подсчитывают число мигрировавших лейкоцитов. Приведенные в табл. 11.2 результаты типичного эксперимента показывают, что полное число переместившихся в ответ на хемотаксисное раздражение лейкоцитов составляет 250—300, в то время как отрицательный контроль¹ дает примерно 30 клеток.

Соответствующими изменениями этой прописи можно обнаружить дефекты нескольких видов: 1) присутствие хемотаксисных ингибиторов в сыворотке больного; 2) наличие у больного дефектных по отношению к хемотаксису клеток; 3) недостаточная генерация хемотаксисной активности под действием зимо-зана в сыворотке больного. В любом из этих случаев число мигрировавших клеток будет близким к значению, соответствующему отрицательному контролю.

¹ Контрольный опыт без использования аттрактантов.— *Прим. ред.*



Рис. 11.5. Хемотаксисная стимуляция перитонеальных макрофагов на мембране Нуклепор с порами 5 мкм. *а* — сторона мембраны, обращенная к клеточной суспензии; заметьте, что большие лейкоциты ориентированы по направлению к порам; маленькие компактные клетки — эритроциты; *б* — сторона мембраны, обращенная к источнику хемотаксисных факторов; лейкоциты мигрировали через поры и скопились на противоположной стороне. (Фото любезно предоставил Шарон Уол, Национальный стоматологический институт, г. Бетезда, шт. Мэриленд.)

Таблица 11.2. Результаты типичного эксперимента по хемотаксису [233]

Содержимое нижней камеры	Число клеток
Контрольный опыт	20
Бактериальный фактор	250
Нормальная сыворотка, активированная зимозаном	300
Нормальная сыворотка	40

Во всех случаях верхние камеры ячеек содержали 10 %-ную сыворотку и $2,5 \cdot 10^6$ донорских моноцитных клеток (полный объем 1 мл). Бактериальный фактор получен разведением 1:5 супернатанта оставленной на ночь культуры *E. coli*. Активация сыворотки зимозаном была проведена путем инкубации свежей сыворотки в течение 1 ч при температуре 37°C с 1 мг/мл раствором зимозана.

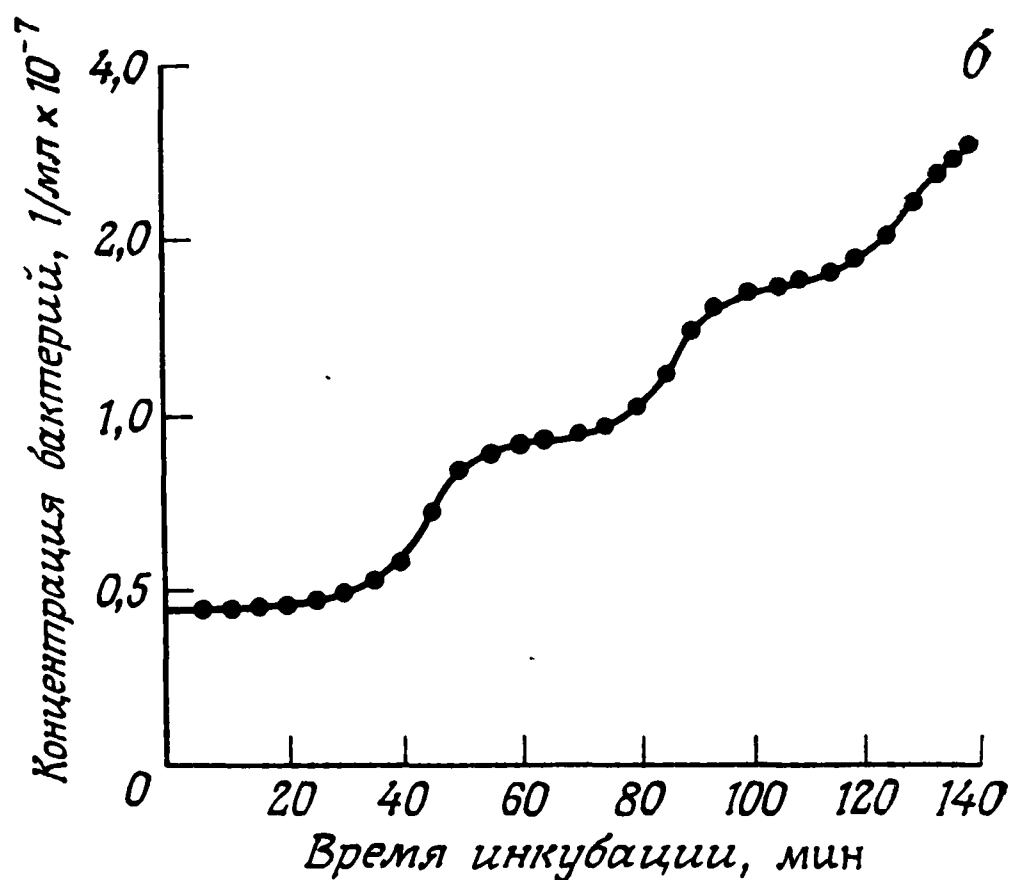
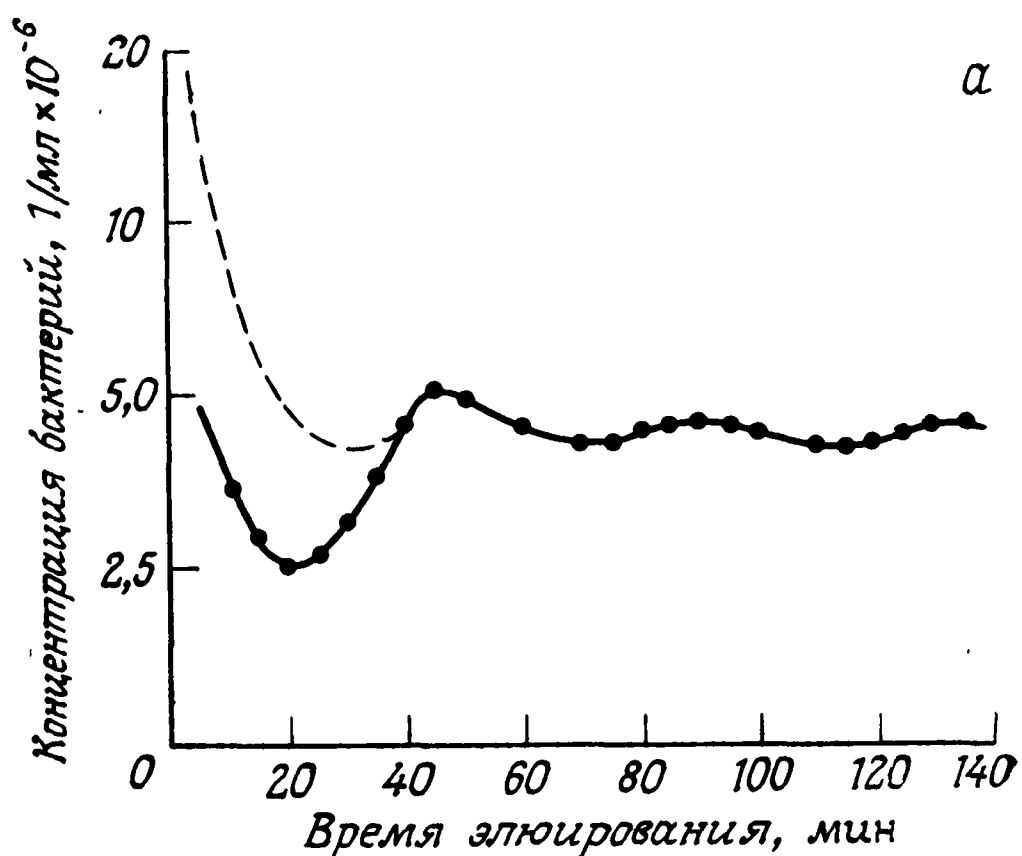
На рис. 11.5 представлена полученная на сканирующем электронном микроскопе микрофотография, которая демонстрирует хемотаксисную реакцию.

11.4. СИНХРОНИЗАЦИЯ РОСТА КЛЕТОК

Метод синхронизации бактериального роста с использованием мембранных фильтров рассматривается Хелмстеттером и Камминсом в работе [102]. Эта методика основана на известном факте адгезии бактерий к поверхности мембранного фильтра, причем величина адгезии — наименьшая для вновь образовавшихся дочерных клеток, которые поэтому могут быть селективно элюированы с мембраны. Поскольку смытые клетки являются юными, все они находятся в одной и той же стадии цитокинеза и воспроизводятся, таким образом, синхронно.

В этом методе была использована мембрана типа GS производства фирмы «Миллипор» из смешанных эфиров целлюлозы с порами 0,22 мкм и диаметром 152 мм. Исходная культура клеток, которую надо было синхронизировать (концентрация клеток $1 \cdot 10^8$ мл⁻¹), была пропущена через мембрану под давлением 0,35 атм таким образом, чтобы 1 л суспензии был отфильтрован за 2,5 мин. Затем мембрану переворачивали и юные клетки смывали с ее поверхности фильтрацией через мембрану 1,5 л истощенной культуральной среды, предварительно отфильтрованной через мембрану Миллипор типа DA с порами 0,65 мкм. Начальная скорость элюирования была 50—60 мл/мин, причем вымывались не связанные с мембраной клетки. Затем скорость элюирования постепенно снижалась до нулевой, после того как через мембрану был пропущен 1 л истощенной культуральной среды. Начиная с этого момента проводился опыт по синхронизации. Элюирование продолжалось, но уже с по-

Рис. 11.6. Синхронизация бактериального роста (из работы [102]). а — элюирование клеток *E. coli* с поверхности мембраны, имеющей диаметр пор 0,22 мкм. Начальное уменьшение числа клеток вызвано вымыванием слабосвязанных клеток; дальнейшее элюирование клеток проходит с почти постоянной скоростью; сплошная кривая — начальная скорость элюирования 55 мл/мин постепенно снижалась до 15 мл/мин; штриховая кривая — скорость элюирования все время сохранялась на уровне 15 мл/мин; б — синхронный рост бактерий, собранных из элюата через 85 мин после начала рециркуляции.



стоянной скоростью (около 15 мл/мин), при этом элюат рециркулировал через мембрану с помощью перистальтического насоса, так что объем жидкости над мембраной поддерживался постоянно на уровне 500 мл.

На рис. 11.6, а показана кривая, демонстрирующая процесс элюирования (использовались клетки *E. coli* В/г). После начального этапа смыва клеток, слабо связанных с поверхностью мембраны, бактерии в элюате состоят из новых дочерних клеток, отделившихся при почти постоянной скорости элюирования. Рис. 11.6, б показывает почти синхронный рост элюированных с мембраны дочерних клеток, когда они инкубируются в свежей среде. Максимальный титр новых дочерних клеток, полученный в элюате, составлял $(6-8) \cdot 10^7$ клеток/мл, что было

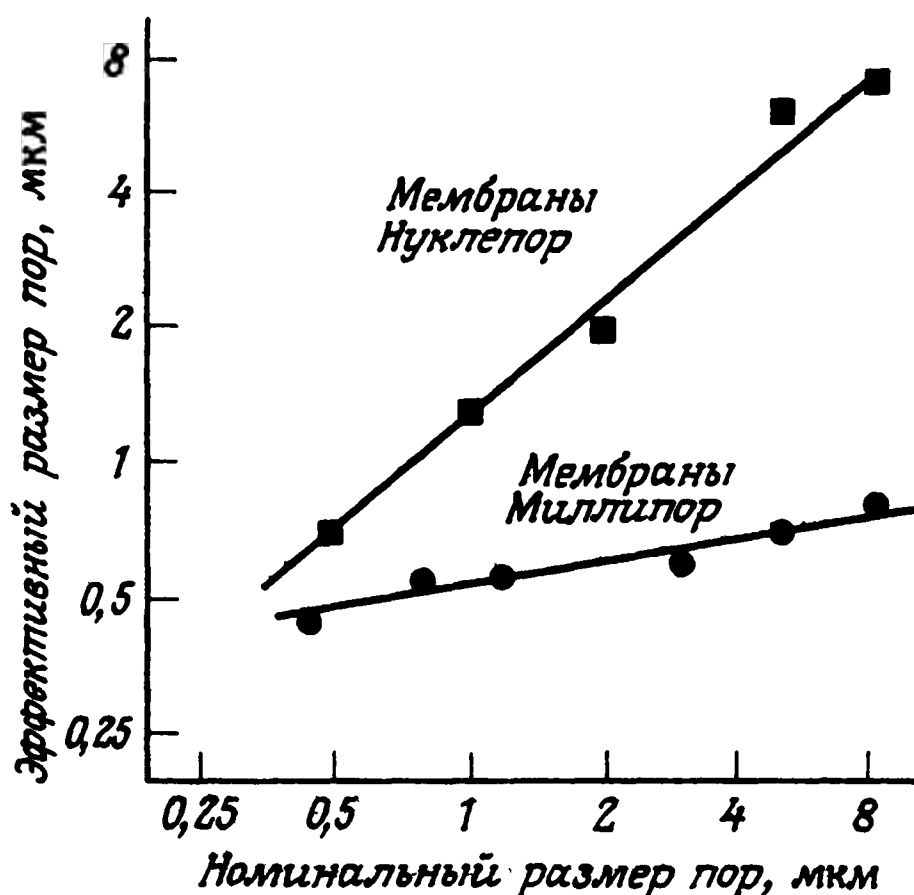
достаточно для проведения экспериментов по определению фаз при синтезе ДНК в процессе клеточного деления с помощью радиоактивной метки [101].

11.5. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК ПО РАЗМЕРАМ

Важное применение мембранных фильтров в микробиологии состоит в разделении содержащихся в водных пробах частиц различного размера. Этот процесс фракционирования клеток по размерам, называемый *просеиванием*, предъявляет к мембранным фильтрам бóльшие требования, нежели простая фильтрация с целью задержать частицы любого размера. Фракционирование по размерам широко используют в методе радиоизотопной инкубации, чтобы определить, какого рода микроорганизмы или скопления микробов ответственны за тот или иной тип процесса. Шелдон [194] провел обширное исследование для определения видов мембран, наиболее подходящих для фракционирования. С помощью электронного счетчика частиц (счетчик Коултера) он определил распределение частиц по размерам в пробах морской воды до и после фильтрации и построил кривые селективности для разных мембран, оценив среднее значение задержки, т. е. размер пор, при котором задерживается 50 % частиц; это среднее значение Шелдон принял за средний размер пор мембраны. На рис. 11.7 проведено сравнение между измеренным таким образом средним размером пор мембран и их номинальным размером, указываемым фирмой-изготовителем (мембраны Миллипор и Нуклепор). Очевидно, что мембраны Миллипор не годятся в качестве сит, хотя они прекрасно работают как задерживающие (для этого они, собственно, и были созданы).

Мембраны Нуклепор отвечают своему назначению в качестве сит и могут быть с некоторыми предосторожностями использованы для фракционирования клеток по размерам. Эти предосторожности необходимо соблюдать при использовании мембран Нуклепор для фракционирования водных суспензий макрочастиц. Поскольку некоторые частицы могут адсорбироваться и на мембранах Нуклепор [242], на поверхности последних могут задерживаться частицы, размеры которых значительно меньше номинального размера пор. Однако Шелдон не обнаружил этого в своем исследовании, возможно, из-за того, что содержание частиц в его пробах было низким. Адсорбция, по-видимому, могла бы обнаружиться при использовании растворов с высоким содержанием частиц, что сделало бы невозможным фракционирование. В любом случае специально по-

Рис. 11.7. Сравнение номинального и эффективного размеров пор для мембран Миллипор и Нуклепор. Эффективный размер пор оценивался специальными тестами на пропускание и определялся как размер, при котором 50 % частиц данной величины задерживается мембраной. (Из работы [194].)



ставленными опытами по подсчету частиц в фильтрате следует подтвердить наличие или отсутствие адсорбции. В некоторых случаях для устранения адсорбции необходимо модифицирование поверхности мембран. С увеличением ионной силы адсорбция, как правило, уменьшается, поэтому она может вызвать затруднения при работе скорее с пресной, нежели с морской водой. Следует также учитывать, что большие объемы клеточных суспензий эффективно фракционировать невозможно вследствие забивания мембран и уменьшения скорости фильтрации, тем более, что при этом нужно поддерживать, как рекомендует Шелдон, малую разность давлений (10—20 мм рт. ст.). Шелдон же показал, что ситовые свойства мембран Нуклепор, несмотря на их забивание, не меняются и распределение частиц по размерам в фильтрате при перегрузках тоже остается постоянным.

Обширному изучению подверглось также фракционирование по размерам атмосферных частиц на мембранах Нуклепор (см. гл. 14).

11.6. СБОР И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мембранные фильтры находят широкое применение и для выделения клеток из жидких сред. Цель при этом состоит не в том, чтобы получить фильтрат, а в том, чтобы получить клетки в неизмененном виде над поверхностью мембраны. Мембранная фильтрация применяется в тех случаях, когда центрифугирование неприемлемо, т. е. когда содержание клеток очень мало, велик объем, подлежащий фильтрации, и клетки являются слишком чувствительными.

Мембранная фильтрация в тупиковом режиме и с использованием тангенциального потока жидкости. Простейший способ концентрирования микроорганизмов с помощью мембранных фильтров — это фильтрация их суспензий в так называемом тупиковом режиме, при котором жидкость проходит непосредственно через мембрану, а микроорганизмы собирают соскабливанием или промывкой мембраны в обратном направлении [221]. Фильтрация в тупиковом режиме не подходит для чувствительных микроорганизмов и приводит к образованию на мембране толстого слоя клеток, в результате чего процесс идет длительное время и (или) необходимы мембранные фильтры с большой поверхностью. Более эффективной является фильтрация в режиме тангенциального потока жидкости над мембраной. Поэтому методу поток жидкости в закрытой системе пропускается под давлением вдоль поверхности мембраны, неотфильтрованный же продукт возвращается в цикл, в фильтрат удаляется. Поскольку жидкость проходит касательно к поверхности мембранного фильтра, большинство частиц при этом поддерживается во взвешенном состоянии и рециркуляция возвращает сконцентрированные частицы обратно к подающему резервуару. Концентрирование клеток таким путем происходит намного быстрее, чем при обычной фильтрации в тупиковом режиме.

Различие между обычной фильтрацией и фильтрацией методом тангенциального потока иллюстрирует рис. 11.8. Метод тангенциального потока вначале был разработан для ультрафильтрации и обратного осмоса (см. гл. 13) и лишь позднее нашел применение при фильтрации частиц через микрофильтрационные мембраны [215—217]. Фирмы «Миллипор» и «Гелман» использовали два различных подхода к фильтрации методом тангенциального потока.

Кассетная система Пелликон фирмы «Миллипор». Фирма «Миллипор» производит кассетную систему Пелликон, которая представляет собой комплект из нескольких плоских листовых мембранных фильтров, разделенных дренажными прокладками и турбуляризаторами сетчатого типа из полиэфира (дакрона) с системой входных и выходных отверстий, причем все устройство собирается в виде компактной кассеты (рис. 11.9). Мембраны в виде листов с размером пор 0,22, 0,45 и 1,2 мкм могут быть изготовлены либо из смешанных эфиров, либо из ацетилцеллюлозы. Число используемых листов может меняться в зависимости от объема пробы, но все устройство должно быть собрано для каждого нового опыта из отдельных слоев мембран и прокладок, что представляет собой трудоемкую процедуру. Собранные из таких слоев кассеты закрепляются между коллекторными пластинами из акрилового пластика, которые в свою очередь зажаты литыми алюминиевыми пластинами, смонтиро-

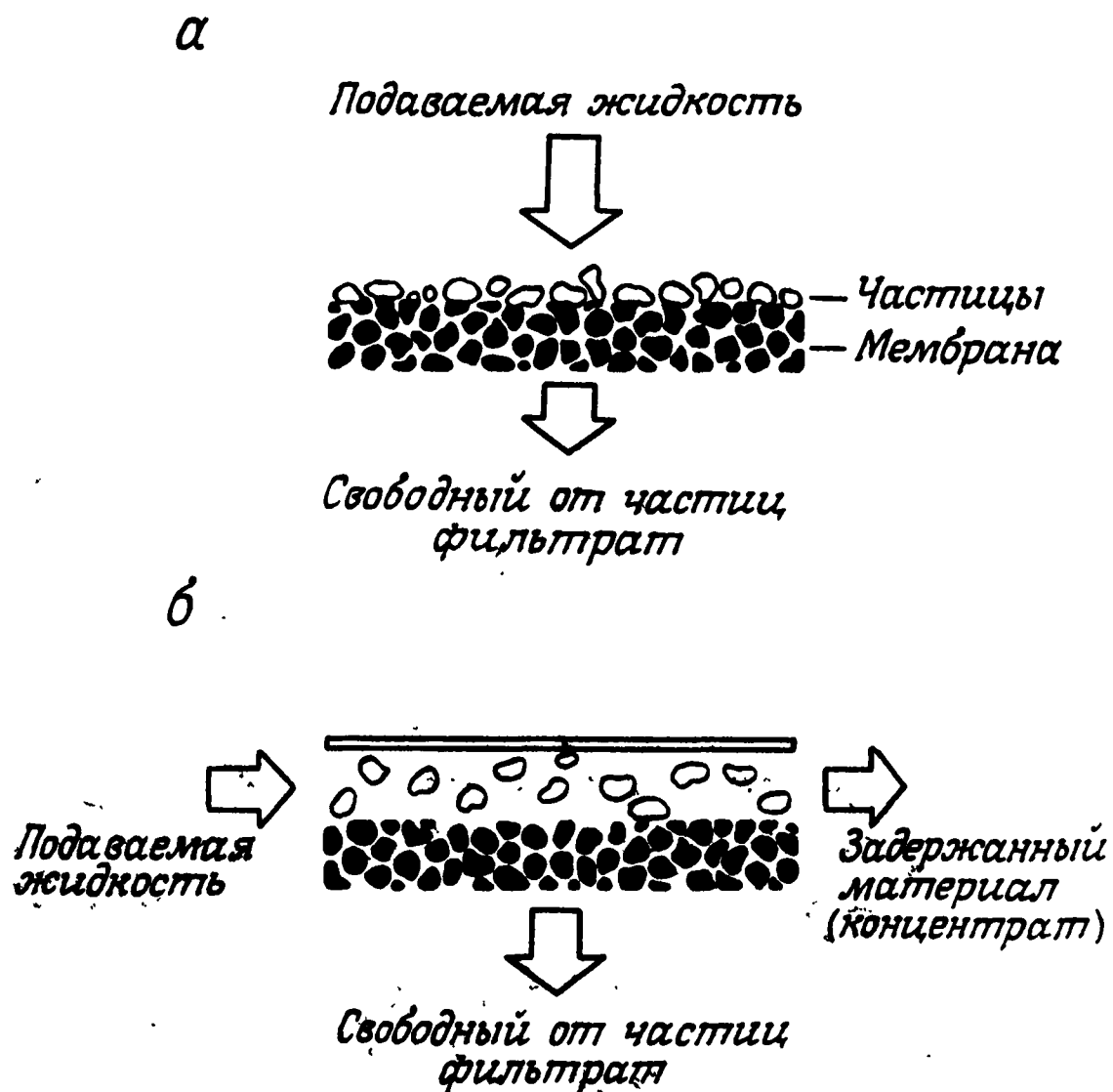


Рис. 11.8. Различие между обычной фильтрацией (а) и фильтрацией методом тангенциального потока (б). Жидкость, проходящая по касательной к поверхности мембраны, смывает частицы и предохраняет мембрану от забивания.

ванными на четырех стягивающих штангах. Дренажные прокладки, разделяющие две соседние мембраны, устроены так, что подаваемая в аппарат жидкость омывает их сверху и снизу, создавая волнообразный поток, что снижает отложение частиц на мембране. Максимально допустимое давление составляет 7 кг/см^2 , максимальная температура 50°C ; суммарная максимальная поверхность мембран 4640 см^2 при установке 10 фильтрующих кассет (одна кассета содержит 20 мембран, поверхность одного листа мембраны 232 см^2).

Устройства, аналогичные системе Пелликон, выпускаются также фирмами «Сарториус» и «Амикон».

Фильтр-патроны Акрофлакс фирмы «Гелман». Эта фирма использует другой подход к фильтрации методом тангенциального потока. Для осуществления такой фильтрации она выпускает в продажу фильтр-патроны Акрофлакс и капсулы. Фильтр-патроны диаметром 64 мм и длиной 25 или 50 см содержат очень прочную гофрированную мембрану из акрилового сополимера с внутренней нейлоновой основой и порами $0,2 \text{ мкм}$. Способ сборки устройства, содержащего гофрированную мембрану, показан на рис. 11.10, а и б. Полипропиленовый турбуляризатор (сетка, турбуляризирующая поток жидкости) отделяет мембрану от внешней оболочки (рис. 11.10, в), и жидкость дви-

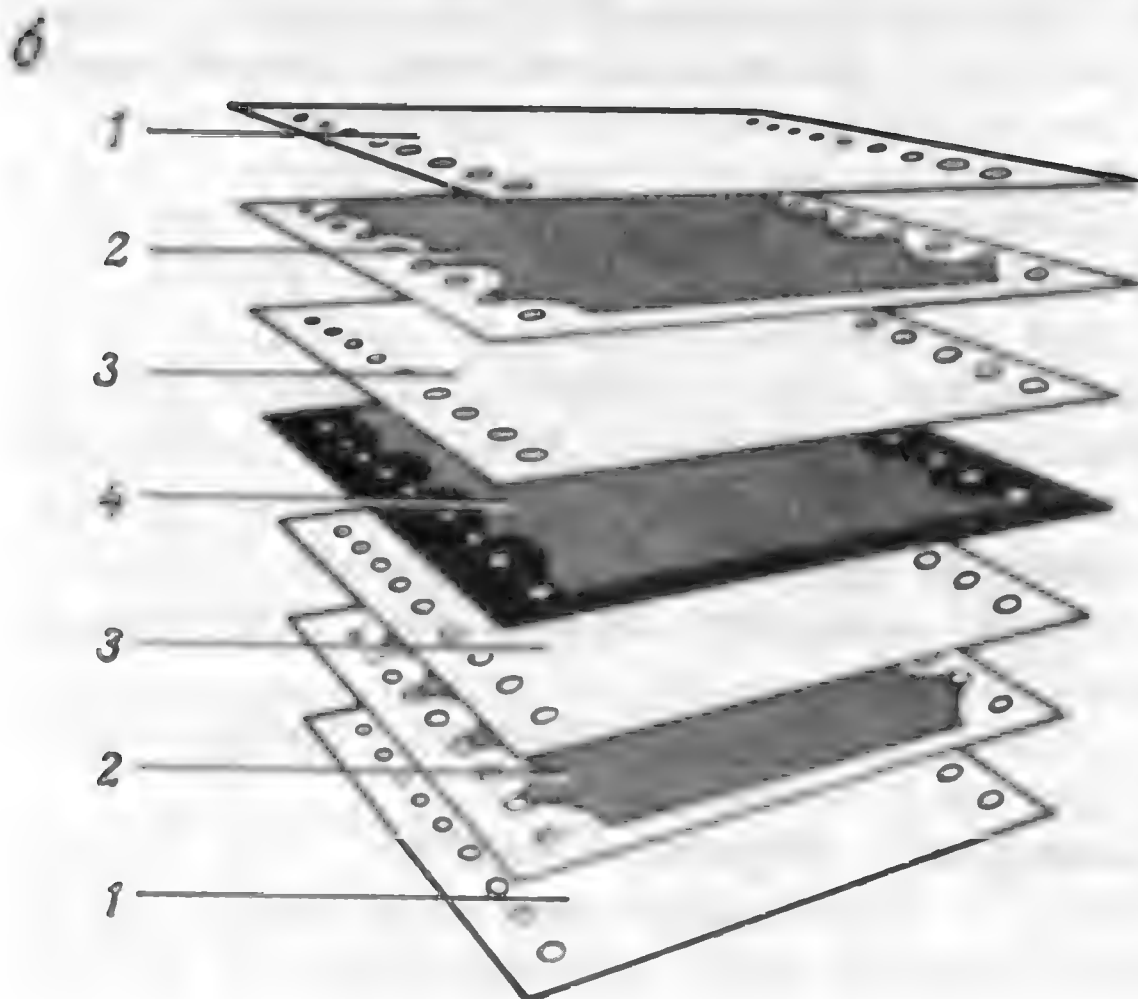
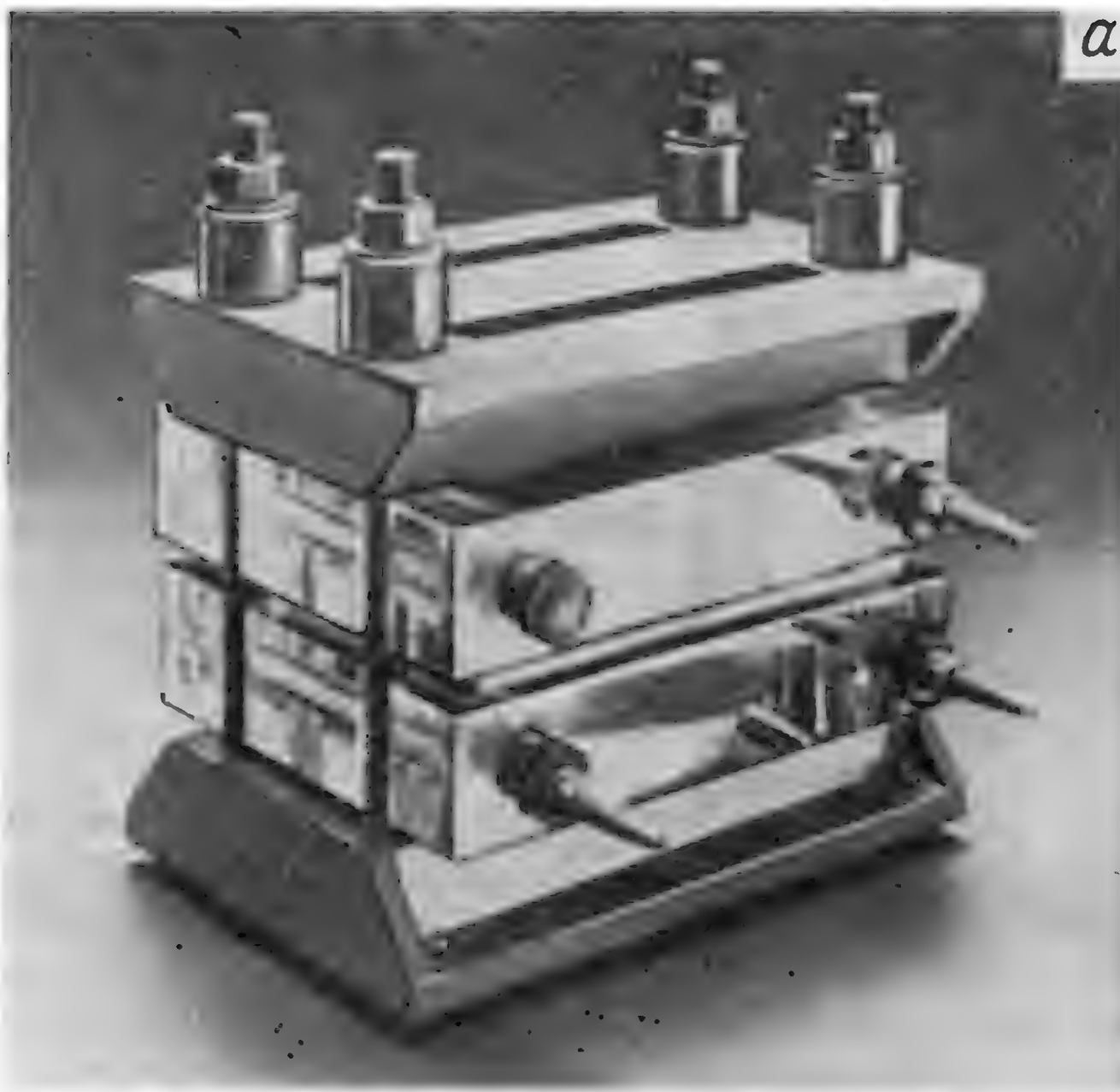


Рис. 11.9. Кассетная система Пелликон фирмы «Миллипор», рассчитанная на установку в ней от одной до десяти фильтровальных кассет. *а* — система в собранном виде (размеры: 254 мм в ширину, 238 мм в глубину; в зависимости от числа мембран высота может быть от 305 до 458 мм) фото любезно предоставлено фирмой «Миллипор»; *б* — схема расположения мембран, турбуляризаторов и прокладок в кассете; 1 — полиэтиленовая прокладка; 2 — дренажная прокладка; 3 — мембранный фильтр; 4 — турбуляризатор потока.

жется волнообразно, снижая тем самым отложение частиц на внешней стороне мембраны. Фильтр-патрон помещается в рассчитанный на работу под давлением корпус из нержавеющей стали или полипропилена (рис. 11.10, *г*), к которому подсоединяют шланги для рецикла (рис. 11.10, *д*). Для очистки фильтр-патрон может быть промыт в прямом или обратном направлении спиртом, щелочью или простой водой. Эффективная фильтрующая поверхность составляет 0,32 м² для фильтр-патрона длиной 25 см и 0,64 м² для фильтр-патрона длиной 50 см. Максимально допустимая разница давлений составляет 5,6 кг/см², а максимальная рабочая температура 88 °С. Прибор при необходимости может быть стерилизован этиленоксидом или гамма-излучением.

Фирма «Гелман» выпускает также неразъемные фильтр-патроны (капсулы), объединяющие в одном устройстве принцип гофрированного фильтр-патрона с принципом тангенциального потока жидкости [217]. Мембранный модуль этого типа обладает фильтрующей поверхностью 1000 см² при размере пор 0,2 мкм. Тинни и др. [217] показали, что благодаря этому модулю удалось значительно ускорить концентрирование бактерий *E. coli*, причем в 1 л жидкости, содержащей первоначально 10⁹ клеток/мл, за 80 мин концентрация бактерий была увеличена в 5 раз. Однако, несмотря на перемешивающее действие тангенциального потока, на мембране наблюдается адгезия значительной части клеток, и не все эти клетки удается снять при промывке в обратном направлении. Авторы работы [217] утверждают, что указанные капсульные фильтр-патроны обладают преимуществами при концентрировании патогенных бактерий, а также для непрерывного выделения продуктов микробного синтеза, таких, как ферменты, антитела или токсины.

При оценке систем Акрофлакс и Пелликон, предназначенных для сбора клеток и основанных на принципе тангенциального потока, следует учитывать их общую стоимость. Система Пелликон представляет собой постоянно действующее устройство, которое стоит несколько тысяч долларов, тогда как срок службы фильтр-патронов и капсул Акрофлакс является ограниченным, но зато их цена составляет лишь несколько сотен долларов. В системе Пелликон мембраны, которые забились, можно заменять, в то время как фильтр-патроны и капсулы Акрофлакс нужно при этом выбрасывать. Время эксплуатации тех и других систем зависит от характера работы, и ни один изготовитель не дает указаний на этот счет.

Фильтрация методом обратного потока. Для концентрирования чувствительных микроорганизмов был использован прибор, названный «фильтром обратного потока» [62, 107, 109, 120]. Аппарат для обратной фильтрации показан на рис. 11.11. Он

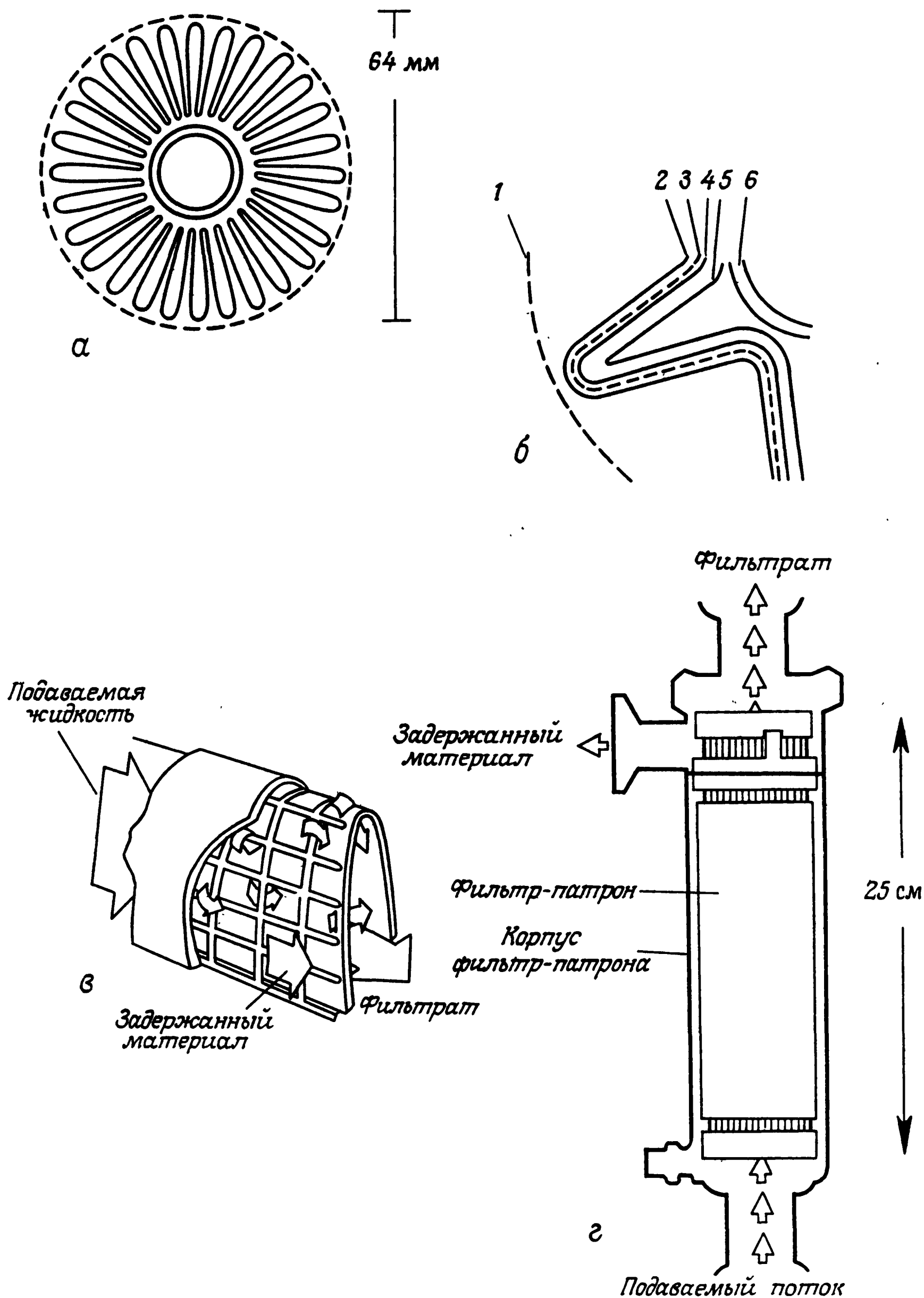


Рис. 11.10. Фильтр-патрон Акрофлакс фирмы «Гелман». а — расположение гофрированной мембраны вокруг центрального стержня; б — поперечное сечение фильтр-патрона, показывающее расположение разных слоев: 1 — внешняя оболочка из полипропилена; 2 — верхняя защитная сетка из полиолефина; 3 — турбуляризатор из полипропилена; 4 — мембрана Акропор из ак-

состоит по существу из пластмассовой коробки с двойными стенками, причем во внутренней коробке вместо дна находится мембранный фильтр. Размеры аппарата зависят от количества суспензии, которое надо отфильтровать. Мембранный фильтр (обычно из эфира целлюлозы) с размером пор 0,8 мкм прикреплен к днищу внутренней коробки и поддерживается сеткой и пластмассовыми перекрестными скобками. Суспензия микроорганизмов стекает в пространство между двумя стенками таким образом, чтобы столб жидкости поддерживался выше уровня мембраны. Высота этого столба не должна превышать 5 см, что достаточно для прохождения через мембрану воды, но не так велико, чтобы повредить чувствительные клетки. Для предотвращения адгезии микроорганизмов к мембране поддерживается слабое перемешивание с помощью вращающегося стержня, расположенного внизу, в зазоре между камерами. Прошедшая через мембрану вода отсасывается, в результате чего столб водной пробы сохраняется на одном уровне.

Хобби и Помероу [107] использовали большие фильтры обратного потока, чтобы сконцентрировать микроорганизмы, содержащиеся в двухстах литрах морской воды, до всего лишь нескольких сотен миллилитров, а дальнейшее концентрирование

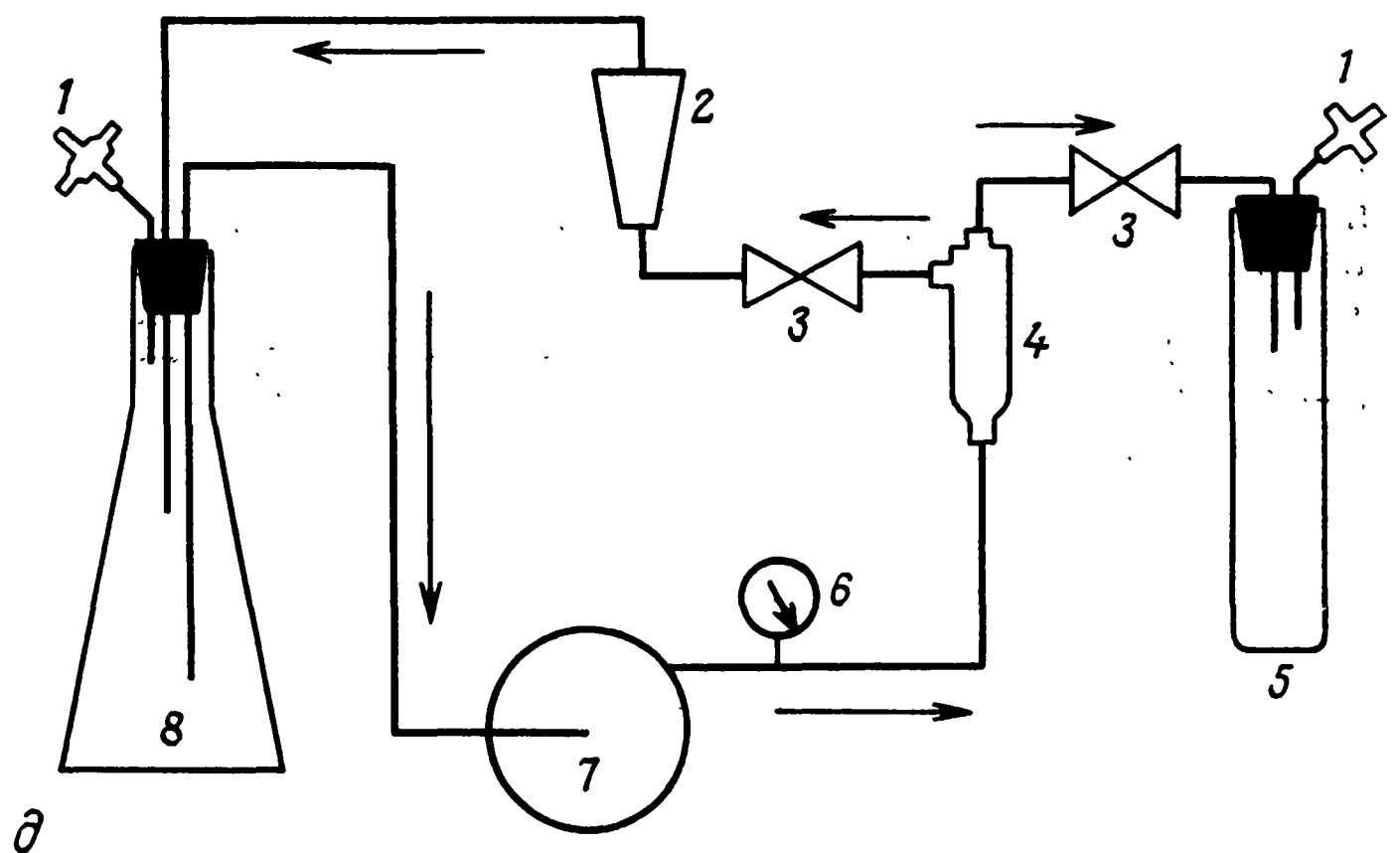


Рис. 11.10. (продолжение)

рилового сополимера с внутренней нейлоновой основой и размером пор 0,2 мкм; 5 — нижняя защитная сетка (дренаж) из полиэфира; 6 — центральный стержень из ацетилового сополимера; 6 — схема разделения подаваемого потока на концентрат и фильтрат; 2 — фильтр-патрон Акрофлак, установленный в корпусе; 2 — схема установки для фильтрации с фильтр-патроном Акрофлак: 1 — воздушный фильтр; 2 — расходомер; 3 — клапан; 4 — фильтр-патрон Акрофлак; 5 — фильтрат; 6 — манометр; 7 — насос; 8 — концентрат.

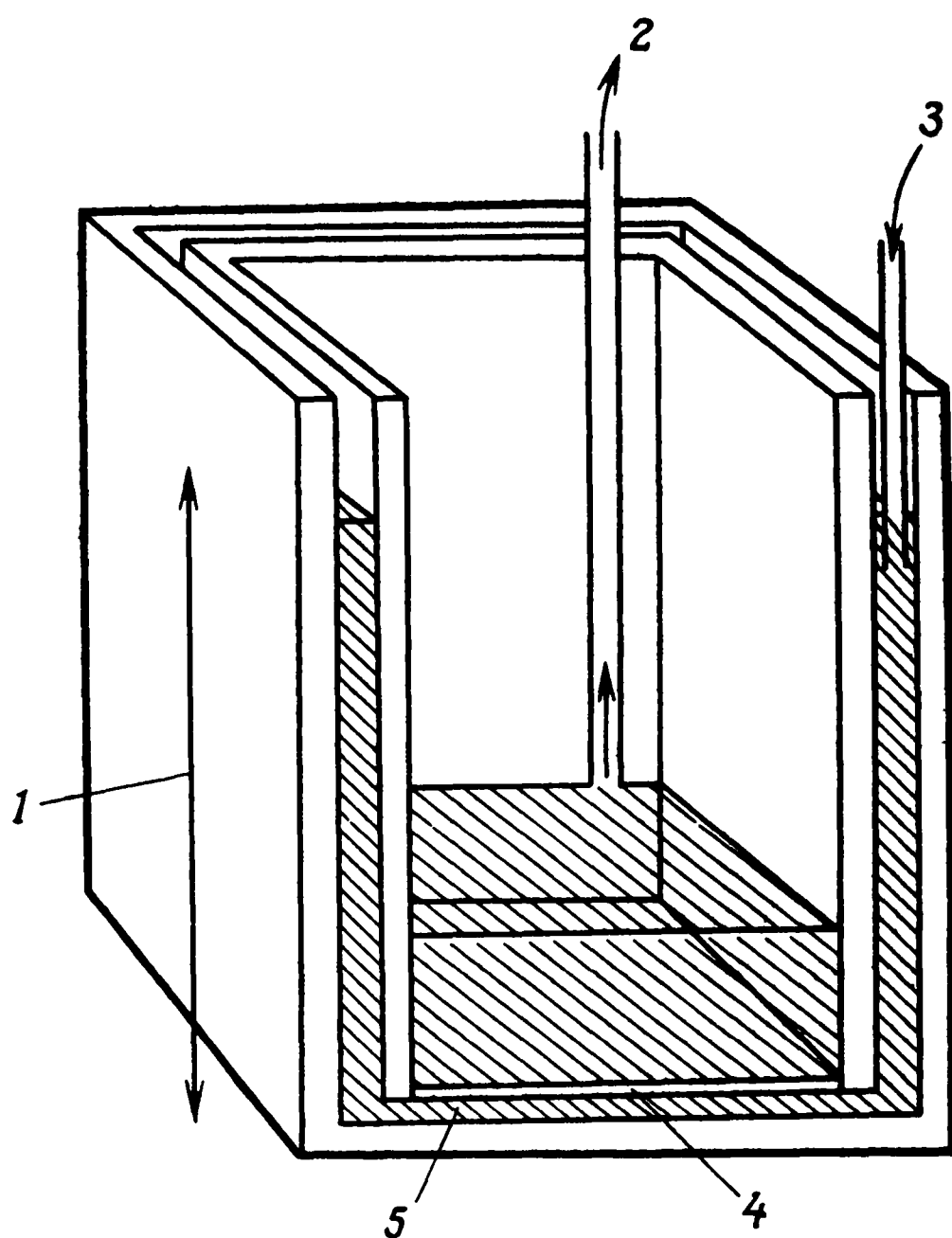


Рис. 11.11. Аппарат для щадящего концентрирования чувствительных микроорганизмов с помощью обратной фильтрации [107]. Перепад давления через мембрану определяется высотой жидкости во внешней камере; для щадящего концентрирования столб жидкости не должен превышать 5 см; при концентрировании разбавленных клеточных суспензий поверхность мембраны должна быть не менее 400 см²; 1 — высота жидкости во внешней камере; 2 — фильтрат (вакуум); 3 — ввод пробы; 4 — мембранный фильтр; 5 — зазор между камерами, где помещается стержень для перемешивания суспензии с помощью магнитной мешалки.

(до 20—30 мл) проводилось с помощью меньшего прибора. Хотя с помощью обратной фильтрации достигается эффективное концентрирование, количественного выделения бактерий не происходит [107, 95]. Более того, Гриффитс и др. [95] пришли к выводу, что бактерии, сконцентрированные при обратной фильтрации, функционально не эквивалентны (как было замечено по потреблению глутамата) тем бактериям, которые находились в пробах необработанной (исходной) воды. Таким образом, хотя первоначальная цель обратной фильтрации состояла в том, чтобы получить сконцентрированную популяцию для метаболических исследований, ясно, что это не могло быть сделано, поскольку выделенные клетки существенно изменились. Следовательно, главное назначение обратной фильтрации дол-

жно, по-видимому, состоять в концентрировании микроорганизмов из больших объемов для использования их в виде источника различных химических соединений (например, пигментов, биохимических компонентов, ферментов и т. д.), но не для изучения метаболических свойств интактных клеток.

Ячейки с перемешиванием. Для осуществления процессов ультрафильтрации нередко необходимо применять фильтрующие системы с перемешиванием, и промышленностью выпускается ряд соответствующих устройств (см. гл. 13). Большинство этих устройств можно использовать также для концентрирования клеток. Фирма «Нуклепор» изготавливает широкий набор ячеек с перемешиванием для фильтрации при низком и высоком давлениях, что позволяет проводить фильтрацию с непрерывным потоком жидкости. Двухмембранная ячейка с перемешиванием содержит магнитную мешалку и две мембраны для увеличения скорости фильтрации. Фирма «Шляйхер и Шуль» производит ячейки для фильтрации под давлением с перемешиванием, снабженные собственным насосом для создания давления и манометром для его измерения и регулировки. Фирма «Миллипор» продает широкий набор ячеек для фильтрации с перемешиванием под мембранами диаметрами 13, 25, 47, 90 и 142 мм.

Следует заметить, что все эти устройства первоначально были предназначены для ультрафильтрации, которая проводится с большими объемами жидкости и при высоком давлении. Замена ультрафильтров на микрофильтрационные мембраны приводит к необходимости использовать более низкие давления, чтобы не повредить как саму мембрану, так и концентрируемые клетки. Фирма «ADAPS, Inc.» продает автоматические ячейки для работы с малыми объемами клеток и супернатантов главным образом для биомедицинских исследований.

11.7. РАДИОИЗОТОПЫ И МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ

Мембранные фильтры находят широкое применение для счета радиоактивных материалов в биомедицинских и химических исследованиях и в работах по изучению окружающей среды. Если в пробе жидкости содержится смесь радиоактивных частиц и растворенного радиоактивного вещества, то мембранная фильтрация позволяет без особого труда разделить эти две фракции. Используя затем жидкостную сцинтилляцию, можно определить радиоактивность частиц на задержанной мембране. Для радиоактивного счета мембранные фильтры используются в биомедицинских исследованиях, возможно, в большей степени, чем для любой другой цели. Радиоактивными могут быть либо

клетки, либо осадок, образованный добавлением соответствующего осаждающего агента. Хотя использование мембранных фильтров в анализе радиоактивных материалов — операция достаточно простая, для получения надежных результатов следует принять некоторые предосторожности.

Улавливание радиоактивности с помощью мембран. Один из наиболее широко применяемых методов — это измерение радиоактивности, поглощаемой бактериями или другими микроорганизмами, которые инкубировались в присутствии какого-либо растворенного радиоактивного вещества. После того как инкубация закончена, образец пропускают через мембрану, которая отделяет ставшие радиоактивными клетки от непоглощенной радиоактивности. Обычно пользуются мембранами из эфира целлюлозы с размером пор 0,45 мкм, хотя при желании можно использовать мембраны с большими и меньшими порами. Если растворенное радиоактивное вещество удаляется с трудом или если желательно прибегнуть к процессу «просеивания» (см. разд. 11.5), то можно использовать трековые мембраны Нуклепор. Как правило, при исследованиях, связанных с поглощением радиоактивности, основная часть последней остается в растворе, так что задача состоит в отделении незначительного количества радиоактивности частиц от высокой радиоактивности раствора. Подчеркнем *исключительную важность* того, чтобы это отделение было полным и чтобы на мембране не оставалось даже следов растворенных радиоактивных веществ, так как в противном случае неизбежна грубая ошибка в результатах. Обычная процедура после фильтрации заключается в том, чтобы промыть мембрану нерадиоактивной жидкостью с целью полного удаления радиоактивного раствора из мембраны. Эффективность промывки следует проверить с помощью соответствующего отрицательного контроля (например, поглощения, измеренного в присутствии клеточного ингибитора), а также провести контрольный опыт, когда раствор радиоактивного вещества пропускается через мембрану без какой-либо предварительной инкубации с образцом. *Совершенно необходимо* удостовериться в том, что в отсутствии клеток на мембране совсем не остается радиоактивности; в противном случае следует использовать мембрану другого типа. Кроме того, возможно загрязнение самих радиоактивных растворов микроорганизмами; последние при этом могут приобретать некоторую радиоактивность и вносить погрешность в измерения. Стерильность растворов должна поддерживаться в любом случае, и, прежде чем использовать радиоактивные растворы, их необходимо обязательно профильтровать.

Одна важная особенность, которую надо иметь в виду, заключается в возможной адсорбции радиоизотопа мембраной.

Идеальный мембранный фильтр должен представлять собой совершенно инертную структуру, которая задерживает частицы, но пропускает растворенные вещества, меньшие по размеру, чем поры. Однако такая идеальная мембрана никогда не была создана. В действительности мембранные фильтры адсорбируют растворенные вещества, и это может стать серьезной проблемой в случае фильтрации малых объемов. Почему именно малых? Потому что матрица мембранного фильтра содержит многочисленные центры, на которых может адсорбироваться растворенное вещество, и насыщения этих центров при прохождении первой порции жидкости через мембрану еще не происходит. При этом любое растворенное в жидкости вещество, способное адсорбироваться на этих центрах, будет таким образом удалено из фильтрата. Если фильтруется большой объем жидкости, то такая адсорбция вряд ли вызовет осложнения, поскольку центры быстро насыщаются и общая концентрация вещества, растворенного в фильтрате, уменьшится незначительно. Другое дело — фильтрация малых объемов, когда, к примеру, подвергается стерилизации очень ценное вещество, находящееся в растворе; в этом случае адсорбция может играть существенную роль.

Данную проблему можно проиллюстрировать с помощью результатов, которые получили Джордан и др. [121]. Эти авторы столкнулись с задержкой на фильтре радиоактивного сульфата $^{35}\text{SO}_4$. Адсорбция происходила даже в том случае, когда мембраны были предварительно выдержаны в растворе нерадиоактивного сульфата натрия, но, как видно из табл. 11.3, большая

Таблица 11.3. Задержка радиоактивного сульфата мембранами Нуклепор и Миллипор [121]

Объем промывающей жидкости, мл	Центр мембраны		Края мембраны	
	Нуклепор	Миллипор	Нуклепор	Миллипор
0	1714	57 141	678	13 232
1	41	1 214	249	3 865
10	15	215	49	1 051
30	19	54	76	141
50		27		653
100		18		76

Приведены числа распадов в минуту. Использовались мембраны диаметром 25 мм с размерами пор 0,22 мкм (Нуклепор) и 0,45 мкм (Миллипор). Мембраны были предварительно выдержаны и промыты 0,1 %-ным раствором Na_2SO_4 ; раствор радиоактивного сульфата был отфильтрован перед использованием. Для испытания через каждую мембрану было пропущено 3 мл 0,1 %-ного раствора Na_2SO_4 , содержащего радиоактивный сульфат с активностью 2,7 микроюри. Центральные части мембран были вырезаны сверлом для пробок. Результаты, полученные с мембранами фирмы «Сарториус» и фирмы «Миллипор», оказались аналогичными.

часть адсорбированной радиоактивности могла быть вымыта. Мембраны Нуклепор адсорбировали меньше вещества, чем мембраны Миллипор, и их также можно было отмыть от радиоактивности. Края мембран в той части, которая находится под фильтродержателем, нельзя промыть достаточно хорошо, так что их не удалось отмыть от радиоактивности, как центральную часть мембран. Поэтому Джордан и др. рекомендуют отрезать эти края, прежде чем определять радиоактивность мембраны с помощью сцинтилляционного счетчика. Они нашли, что чем меньше концентрация фильтруемого радиоактивного материала, тем меньшую проблему представляет адсорбция. Поэтому именно те растворы, которые обладали первоначально высокой удельной активностью, требовали особого подхода. В любых условиях лучшими для фильтрации таких радиоактивных материалов были мембраны Нуклепор.

Другая проблема, возникающая в случае фильтрации малых объемов,— это потери фильтруемой жидкости остающейся в матрице мембраны. Если мембрану нельзя промыть (так как это привело бы к разбавлению фильтрата), то значительная часть вещества, растворенного в малом фильтруемом объеме, будет потеряна. Некоторые типы мембран имеют большой объем пор и поэтому впитывают еще больше жидкости. Мембраны Нуклепор, однако, обладают много меньшим объемом пор и, следовательно, лучше всего подходят для фильтрации малых объемов веществ в тех случаях, когда стремятся получить именно фильтрат.

Общие принципы при счете радиоактивности. При счете радиоактивного вещества, захваченного на мембранном фильтре, следует рассмотреть три вопроса:

1. *Самопоглощение.* Образец сам будет поглощать некоторую часть излучения, мешая ему достичь сцинтилляционной смеси.

2. *Химическое тушение.* Химические соединения, находящиеся в образце или извлеченные из мембраны, могут ослаблять сцинтилляцию.

3. *Тушение красителями.* Окрашенные вещества, извлеченные из образца или мембраны, будут поглощать фотоны, понижая тем самым общее их количество, достигающее фотоэлементов жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Комбинация образец — мембрана может быть либо полностью растворимой, и в этом случае речь идет о гомогенной системе, либо же образец может остаться нерастворенным, и тогда говорят о гетерогенной системе.

Гетерогенные системы для счета вполне удовлетворительны в случае ^{14}C и других источников β -излучения высокой энергии.

Необходимо лишь, чтобы мембрана была полностью увлажнена сцинтилляционной смесью. Положение мембраны в стаканчике для счета несущественно, но она должна быть полностью прозрачна. Однако следует заметить, что если мембрана не была высушена полностью перед помещением в сцинтилляционную жидкость, то вода в ней образует непрозрачную пленку, которая будет поглощать свет. Кроме того, образец может растворяться в этой жидкости, даже если мембрана не растворяется, и это может приводить к снижению эффективности счета в случае, когда растворенный образец вызывает химическое тушение или тушение красителями.

Химическая чувствительность мембран разных типов была рассмотрена в разд. 4.5. В сцинтилляционной смеси разные мембраны ведут себя различным образом. Приведем краткую сводку:

Материал мембраны	Толуол	Диоксан
Нитрат целлюлозы	Прозрачен	Растворяется
Ацетат целлюлозы	Прозрачен	Растворяется
Тефлон	Непрозрачен	Непрозрачен
Стекловолокно	Прозрачно	Прозрачно

Гомогенные системы необходимы для счета β -излучения низкой энергии таких источников, как тритий. Самопоглощение образцом или мембраной может быть значительным, хотя в большинстве случаев образец причиняет, пожалуй, больше трудностей, чем мембрана. Оно будет представлять более значительную проблему при увеличении размера частиц осадка, при увеличении общей массы осадка или при неравномерном распределении осадка на мембране. Поскольку самопоглощение трудно определить количественно, трудно оценить и абсолютную эффективность счета.

Как получить гомогенную систему для счета? Можно растворить образец, не растворяя мембрану, хотя в большинстве случаев мембрана, по-видимому, будет так же хорошо растворяться. Однако следует помнить, что, если мембрана растворима в смеси, образец может не растворяться и система окажется гетерогенной. Кроме того, в некоторых случаях применение растворителя для счета, полностью растворяющего мембрану, может оказаться нежелательным, поскольку он сам приводит к некоторому тушению. При работе с биологическими материалами для солиubilизации обычно прибегают к **щелочному гидролизу**. Некоторые запатентованные системы для счета используют четвертичные амины (например, NCS производства фирмы «Амершам/Сирл» и Протосол фирмы «Нью инглэнд нуклеар»), пригодные для мембран из ацетилцеллюлозы, но не из нитроцеллюлозы. Другой способ состоит в полном растворении

образца нагреванием его при температуре 50 °С во флаконе для счета с несколькими миллилитрами концентрированного раствора КОН, NaOH или NH₄OH с последующим добавлением сцинтилляционной жидкости, которая смешивается с водой (такой, как смесь на основе диоксана). Щелочной гидролиз может не привести к полному растворению мембраны, но это не так важно, если мембрана не мешает счету, находясь на дне флакона. Однако нитроцеллюлозные мембраны дают с КОН или NaOH коричневую окраску, поэтому для растворения мембран этого типа следует применять NH₄OH.

Если необходимо провести счет образцов, вызывающих сильное тушение, или объемистых осадков с низкой радиоактивностью, предпочтительнее сжечь образец и превратить радиоактивный материал в ¹⁴CO₂ или ³H₂O. Радиоактивный газ улавливается сцинтилляционной смесью, что дает гомогенную систему для счета. Фильтры из тефлона и стекловолокна не горят, поэтому, если сжигание необходимо, следует пользоваться фильтрами из эфиров целлюлозы.

Следует подчеркнуть, что для получения максимальной воспроизводимости счета в одной экспериментальной серии все образцы должны быть обработаны одинаково.

Счет радиоактивности в случае радиоактивно меченных нуклеиновых кислот. Для этого вещество осаждают обычно такой кислотой, как трихлоруксусная, и затем отфильтровывают. В случае нуклеиновой кислоты, меченной тритием, особенно при низком уровне радиоактивности, фильтрацию следует проводить очень тщательно. Этот вопрос подробно рассматривают Шрайер и Вильсон [184], которые рекомендуют использовать не мембраны, а фильтры из стекловолокна. Речь идет о выполненных из сверхтонкого волокна фильтрах типа GF/F фирмы «Ватман» (номинальный размер пор 0,7 мкм), которые прекрасно задерживают очень мелкие частицы. Применение этих фильтров может потребовать солюбилизации радиоактивных веществ, но для большинства приложений счет оказывается удовлетворительным, а также более удобным и без солюбилизации. Для счета малых образцов необязательно фильтровать образец под вакуумом. Вместо этого каждый образец прикладывают к дисковому фильтру, после чего реакцию прерывают, погружая фильтр в холодную трихлоруксусную кислоту. При этом макромолекулярный продукт осаждается равномерно по всей поверхности фильтра, который затем может быть промыт декантацией. После этого фильтры сушат на воздухе и производят счет. При работе с большим количеством образцов, таких, как фракции, получаемые при колоночной хроматографии или градиентном центрифугировании, можно использовать стекловолоконные фильтры в виде полос, причем фракции наносят прямо на фильтр, кото-

рый целиком подвергается обработке. После того как промывка закончена, участки, содержащие эти фракции, вырезают и помещают в сцинтилляционные флаконы. Стекловолоконные фильтры находят широкое применение также и для разделения связанных и свободных антител в радиоиммунных опытах, где они заменяют центрифугирование [86, 214]. В следующем разделе мы рассмотрим связывание нуклеиновых кислот с помощью мембранных фильтров.

11.8. ИЗУЧЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В предыдущем разделе мы рассмотрели счет радиоактивно меченных нуклеиновых кислот. Однако мембранные фильтры играют и другую важную роль в исследовании нуклеиновых кислот благодаря их способности избирательно связывать эти макромолекулы. Мембраны из нитрата (но не ацетата) целлюлозы связывают денатурированную ДНК и гибриды РНК/ДНК, пропуская в то же время свободную РНК. Согласно данным фирмы «Миллипор», нитроцеллюлозные мембраны связывают однонитевую ДНК в количестве 50—80 мкг/см², в то время как ацетилцеллюлозные мембраны связывают только 1 мкг/см². Благодаря такому селективному связыванию нитроцеллюлозные мембраны можно использовать при изучении гибридизации нуклеиновых кислот. В самом деле, это уникальное свойство нитроцеллюлозных мембран сыграло важную роль в исследованиях, ведущих к развитию технологии рекомбинантных ДНК.

Ряд изготовителей выпускают мембранные фильтры, специально рекомендуемые для гибридизации нуклеиновых кислот. Широко используются мембраны фирмы «Шляйхер и Шуль», которые изготавливаются из чистой нитроцеллюлозы. Среди других фирм, выпускающих мембраны преимущественно из нитроцеллюлозы, следует отметить «Сарториус», «Майкрофильт-рейшн системс» и «Миллипор». В дополнение к своим стандартным мембранам типа НА фирма «Миллипор» предлагает набор мембран типа НАНУ, которые, как утверждается, изготовлены именно для работ по гибридизации нуклеиновых кислот. Эти мембраны, предназначенные для специальных тестов на связывание нуклеиновых кислот, выпускаются под чашки Петри диаметром 90 и 150 мм, а также в виде листов площадью 0,1 м² и 0,3×3 м. Фирма «Нью инглэнд нуклеар» продает запатентованный мембранный материал, названный «генным экраном» (Gene Screen), специально для работ по нуклеиновым кислотам. Состав и размер пор этой мембраны не указаны, и она не рекомендуется для обычной фильтрации. По утвержде-

нию фирмы главным преимуществом «генного экрана» является то, что изготовленные из этого материала мембраны оказываются прочными на растяжение и изгиб. По-видимому, не было проведено систематического сравнения мембран различных фирм-изготовителей с точки зрения применения их для гибридизации нуклеиновых кислот, и рекламные объявления — это все, что мы имеем для обоснования выбора мембраны.

Гибридизация нуклеиновых кислот. Метод гибридизации нуклеиновых кислот, который впервые описали Нигаард и Холл [158], подробно рассматривают Бовр и др. [35]. Метод Нигаарда и Холла включал в себя гибридизацию радиоактивно меченной РНК с немеченой ДНК в растворе с последующей фильтрацией. Количество РНК, гибридизированной с ДНК, определяли по величине радиоактивности задержанных мембраной частиц. Джиллесли и Спигелмэн [87] впоследствии модифицировали этот метод следующим образом. Сначала они позволяли денатурированной ДНК связаться с матрицей мембраны, а затем проводили гибридизацию меченой РНК непосредственно на мембране. Согласно Бовру и др., метод Нигаарда и Холла обладает определенными преимуществами по сравнению с этой модификацией, однако метод Джиллесли и Спигелмэна оказывается более удобным в тех случаях, когда испытания проводятся с большим количеством однотипных образцов.

В методе Джиллесли и Спигелмэна мембраны для гибридизации готовятся (рис. 11.12) путем медленной фильтрации раствора одонитевой ДНК через нитроцеллюлозную дисковую мембрану (диаметром 25 мм с размером пор 0,45 мкм). Затем проводится связывание ДНК на мембране путем подсушивания последней при температуре 80 °С в течение двух часов. Полученную таким образом мембрану используют в эксперименте по гибридизации, а после его окончания мембрану промывают, обрабатывают рибонуклеазой, чтобы удалить негибридизованную РНК, сушат и определяют радиоактивность.

Для гибридизации ДНК/ДНК, когда как связанная, так и гибридизированная нуклеиновые кислоты является одонитевыми ДНК, необходимо предварительно обработать мембрану, чтобы блокировать центры неспецифического связывания ДНК на нитроцеллюлозе. С этой целью Денхардт [61] успешно использовал 0,02 %-ные растворы фикола, поливинилпирролидона и бычьего сывороточного альбумина.

Де Лей и Де Смедт [59] подробно рассмотрели применение метода гибридизации нуклеиновых кислот для исследований в области систематики бактерий.

Методы переноса пятен. Мембраны из нитрата целлюлозы находят широкое применение в технологии рекомбинантных ДНК. Фрагменты нуклеиновых кислот, полученные обработкой

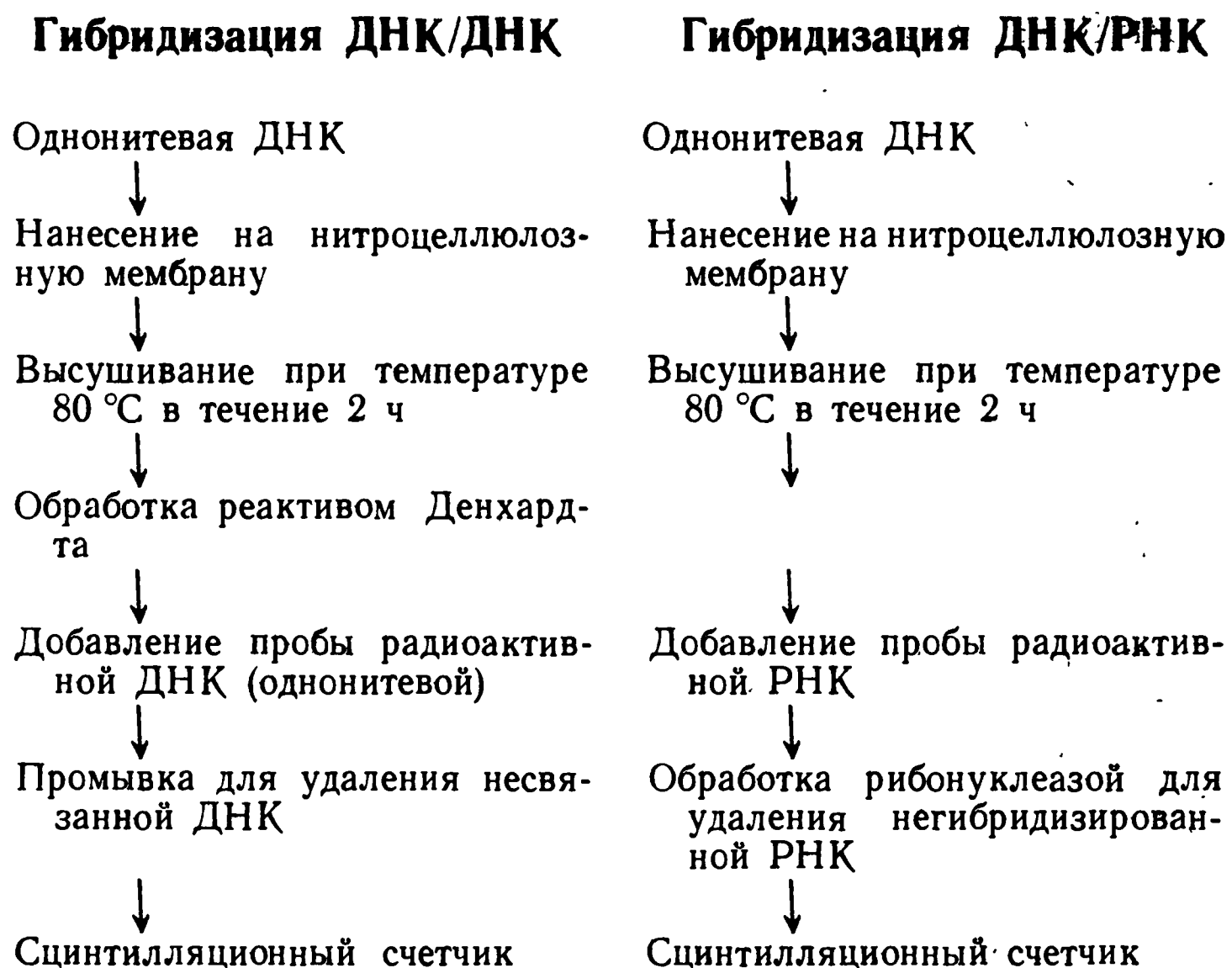


Рис. 11.12. Последовательность операций в методе гибридизации нуклеиновых кислот на мембранных фильтрах.

их рестриктазами, разделяются электрофоретически на агарозе или полиакриламидном геле. Специфические фрагменты ДНК обнаруживаются затем путем гибридизации с помощью проб радиоактивно меченой нуклеиновой кислоты. Гибридизацию проводят после того, как фрагменты нуклеиновой кислоты будут физически перенесены с геля на мембранный фильтр (процедура, получившая название «перенос пятен», англ. blotting). Перенос производится таким образом, чтобы зафиксировать расположение пятен, которое было на геле. Это позволяет локализовать сегменты ДНК, комплементарные выбранной радиоактивной нуклеиновой кислоте (обычно РНК). Если для определенного белка радиоактивная РНК является информационной, то метод позволяет выделить ген этого белка. После идентификации гена его можно связать с соответствующим вектором клонирования и клонировать выращиванием в подходящем бактериальном штамме.

Метод переноса пятен ДНК первоначально разработал Сазен [207], и он получил неофициальное название «сазенблоттинг» («южный перенос») ¹. В случае когда переносятся фраг-

¹ Фамилия Сазен (Southern) означает южный.— Прим. перев.

менты РНК, а не фрагменты ДНК, метод называют «нозенблоттинг» («северный перенос»).

Подробное описание метода «южного переноса» дают Шляйт и Венсинк [183], а также фирма «Шляйхер и Шуль» в сопровождающей документации. Гель, содержащий разделенные фрагменты ДНК, вначале проявляют этидийбромидом, чтобы визуально обнаружить полосы ДНК; следовало бы сделать фотографии для будущих работ. Затем выбранные участки геля удаляют шпателем и помещают в чашку. Денатурируют ДНК щелочной обработкой, потом нейтрализуют, замочив в буферном растворе. Лист мембраны из нитроцеллюлозы опускают на поверхность дистиллированной воды, чтобы полностью его увлажнить. Для переноса небольших фрагментов нуклеиновой кислоты лучше могут подойти мембраны с порами 0,22 мкм, чем с порами 0,45 мкм, хотя мембранами с последними порами пользуются наиболее часто. С мембраной нужно обращаться осторожно, чтобы избежать отпечатков пальцев, грязи или повреждения мембраны. При работе с мембраной следует всегда применять пластиковые перчатки. Если на мембране после увлажнения остаются сухие пятна, ее необходимо на короткое время подержать в кипящей воде. Если увлажнению мембраны препятствуют пузырьки воздуха, скопившиеся под ней, то их следует удалить потиранием. В случае когда мембрану невозможно увлажнить равномерно, она должна быть высушена на фильтровальной бумаге и затем ее нужно попытаться снова увлажнить. После полного увлажнения мембрану переносят в солевой цитратный буфер.

Большие фрагменты ДНК (10 тысяч пар оснований или больше) не переносятся хорошо с геля, и их вначале надо перевести в более мелкие фрагменты кислотной депуринизацией или ультрафиолетовым облучением. С другой стороны, фрагменты, состоящие менее чем из 250 пар оснований, не связываются достаточно эффективно с нитроцеллюлозой, и для улучшения связывания рекомендуется провести глиоксилирование ДНК.

Процедура переноса пятен иллюстрируется на рис. 11.13. Необходимо провести буферный раствор через гель на нитроцеллюлозную мембрану таким образом, чтобы фрагменты ДНК были элюированы с геля на мембрану с сохранением своего первоначального расположения. Сначала в буфер, служащий для переноса пятен, укладывают несколько листов толстой фильтровальной бумаги, действующих как тампон. Сверху на этот тампон помещают гель таким образом, чтобы он находился над поверхностью буферного раствора, а на гель — заранее увлажненную нитроцеллюлозную мембрану. Затем на мембрану укладывают пачку сухих листов фильтровальной бу-

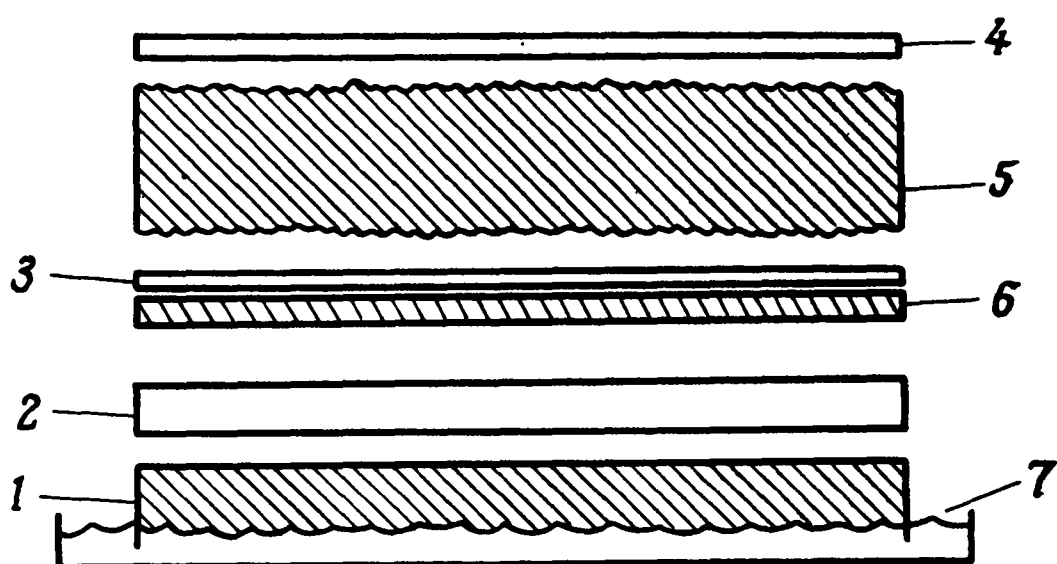


Рис. 11.13. Расположение фильтровальной бумаги, геля и нитроцеллюлозной мембраны при использовании метода Сазена. ДНК переносится с геля на мембрану за 3—12 ч. 1 — тампон из фильтровальной бумаги; 2 — гель; 3 — фильтровальная бумага; 4 — груз; 5 — рыхлый слой бумаги (промокающая бумага или бумажная салфетка); 6 — мембранный фильтр; 7 — буфер для переноса пятен.

маги или же несколько листов фильтровальной бумаги и пачку бумажных салфеток, а на них стеклянную пластинку и какой-нибудь груз. Необходимо обратить внимание на то, чтобы эти бумажные салфетки не касались увлажненной бумаги внизу, так как это привело бы к «короткому замыканию» буферного раствора.

Скорость переноса ДНК пропорциональна десятичному логарифму ее длины. Фрагменты, состоящие из меньшего числа оснований, чем 1 тысяча, переносятся в течение нескольких часов, а для полного переноса обычно хватает 12 ч. После этого нитроцеллюлозную мембрану удаляют и сушат при температуре 80 °С в течение 1 ч, чтобы зафиксировать ДНК на мембране. Высушенные мембраны могут храниться в сухом виде при температуре 4 °С месяцами.

В случае использования мембран большого размера гибридизация проводится аналогично описанной выше в этом разделе, но с некоторыми изменениями. Если в качестве радиоактивного зонда применяется ДНК, то, чтобы избежать неспецифического связывания, мембрану необходимо предварительно обработать реактивом Денхардта. Реакция гибридизации проводится в пластмассовых пакетах, которые можно запечатать при нагревании (пакеты для пищевых продуктов). При работе с мембраной размером 12×17 см достаточно 15 мл содержащего радиоактивный зонд раствора для гибридизации. Пакет запечатывают со всех четырех сторон так, чтобы воздушных пузырьков было по возможности меньше, и затем погружают в водяную баню при температуре, подходящей для радиоактивного зонда. На поверхности мембраны не должно быть никаких пузырьков воздуха. После гибридизации и про-



Рис. 11.14. Использование нитроцеллюлозной мембраны для снятия ДНК с вирусных бляшек. (Фото любезно предоставлено фирмой «Шляйхер и Шуль».)

мывки (с обработкой рибонуклеазой, если в качестве радиоактивного зонда использовалась РНК) местоположение радиоактивных полос определяют автордиографией.

Согласно Шляйту и Венсинку [183], разные партии нитроцеллюлозных мембран существенно различаются по количеству меченой нуклеиновой кислоты, которую они неспецифически связывают. Неспецифическое связывание обнаруживается на автордиограммах в виде общего серого фона или в виде отдельных темных пятен. Однако фирмы «Миллипор» и «Шляйхер и Шуль» в настоящее время выпускают нитроцеллюлозные мембраны, которые специально проверяются на использовании их в методе переноса пятен, поэтому этих различий можно до известной степени избежать.

Поскольку нитроцеллюлоза связывает также и белки (около 100 мкг/см^2), можно использовать метод, аналогичный переносу Сазена, чтобы сохранить картину распределения белков, разделенных электрофоретически. Вместо простой диффузии, используемой при переносе пятен РНК и ДНК, для миграции

белков необходим электрофорез. Этот метод, шутливо называемый «вестернблоттингом» («западным переносом»), используется для идентификации специфических белков, которые обнаруживаются с помощью радиоактивного зонда, например специфических антител¹ [36].

Другое назначение мембран из нитроцеллюлозы применительно к технологии рекомбинантных ДНК заключается в обнаружении молекул специфической ДНК в бактериальных колониях, выращиваемых в чашках с агаром (рис. 11.14). С помощью соответствующего раствора ДНК освобождается из бактериальных колоний или вирусных бляшек. Затем над колониями помещают листовую мембрану из нитроцеллюлозы, и некоторое количество свободной ДНК переносится на мембрану. При использовании в виде зондов радиоактивных РНК и ДНК точное расположение на мембране искомой ДНК определяется гибридизацией и последующей авторадиографией. Соответствующая колония на исходной чашке после этого переносится для дальнейшего изучения.

11.9. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ

Электрофорез широко используется в клинической медицине для изучения сывороточных белков, а также находит обширное применение в биомедицинских исследованиях. Из-за конвекционных потоков при проведении электрофореза необходимо пользоваться твердой подложкой; это привело к использованию большого числа таких подложек, как целлюлозная бумага, крахмальный и акриламидный гели. Полимерные мембраны, подобные тем, что были разработаны для мембранной фильтрации, обладают, как оказалось, ценными свойствами для электрофореза белков. Они позволяют использовать более высокое напряжение, чем целлюлозная бумага, что приводит к более быстрому разделению белков. Поскольку белки подвержены тепловой денатурации, быстрое проведение электрофореза уменьшает трудности, связанные с изменениями белков в ходе этого процесса.

При электрофорезе белков используют мембраны из ацетилцеллюлозы. Как было отмечено, мембраны из нитроцеллюлозы сильно связывают макромолекулы и поэтому их нельзя применять для электрофореза. Сотрудники фирмы «Гелман» провели обширные исследования [80], чтобы определить, какой тип полимерной мембраны является лучшим для электрофо-

¹ Антитела во многих случаях метят не радиоактивно, а с помощью ферментов (например, пероксидазой хрена).— *Прим. ред.*

реза сывороточных белков. Результаты этих исследований показали, что среди различных подложек наилучшее разделение и наименьшее связывание белков обеспечивают мембраны из диацетилцеллюлозы. Оптимальный размер пор оказался равным 0,35—0,45 мкм. Фирма «Гелман» продает мембраны *Сепрафор* из ацетилцеллюлозы, специально предназначенные для электрофореза. Мембраны типа Сепрафор III изготавливаются разных размеров и не имеют подложки, в то время как мембрана Супер Сепрафор и Сепрафор X, имеющие тонкую подложку из майлара, удобнее в обращении и обладают большей гибкостью и лучшей упругостью в аппарате для электрофореза. Фирма «Гелман» производит также полный набор фильтродержателей, реактивов и оборудования для электрофореза белков. Мембраны из ацетилцеллюлозы для электрофореза производятся также фирмами «Бекман инструментс компани», «Хелена лэборэтриз», «Миллипор», «Оксойд», «Шляйхер и Шуль» и «Сарториус». Некоторые из этих фирм продают также оборудование для электрофореза.

11.10. ФИЛЬТРАЦИЯ ВОДНЫХ ПРОБ ДЛЯ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Фильтрация водных проб перед их химическим анализом представляет собой самую распространенную процедуру в различных отраслях промышленности и в экологии. Фильтрацию, как правило, проводят для отделения нерастворимых компонентов от растворимых, чтобы иметь возможность подвергнуть анализу растворимую фракцию. Заметим, что слово «растворимый» не имеет особого химического смысла, но применяется в зависимости от конкретной цели фильтрации. Если «растворимый» относится только к низкомолекулярным компонентам, то должны быть использованы методы ультрафильтрации (см. гл. 13), но для общих целей водного анализа применяется фильтрация через мембраны и фильтры из стекловолокна, так что некоторые достаточно большие макромолекулы могут оказаться в растворимой фракции [212].

Следует подчеркнуть, что в самих мембранных фильтрах могут содержаться «растворимые» компоненты; они внедряются в структуру мембраны во время производственного процесса и могут загрязнить фильтрат и испортить эксперимент. Поэтому при работе такого рода совершенно необходимо часто проводить холостые определения и тщательно промывать мембранные фильтры перед их использованием. В водном анализе мембранные фильтры часто применяют для разделения растворимых и нерастворимых фосфорсодержащих компонентов. Од-

нако во многих случаях мембранные фильтры оказываются загрязненными значительными количествами растворимого фосфата. Фирма «Сарториус» изготавливает из нитроцеллюлозы серию свободных от фосфатов мембранных фильтров, имеющих обозначение RF, с размерами пор 0,45 мкм; они могут принести особенно большую пользу для водного анализа.

Для анализа макрочастиц, содержащихся в водной пробе, фильтрация через мембрану или фильтр из стекловолокна во многих случаях является наилучшим методом концентрирования этих частиц. Химический компонент, задержанный и сконцентрированный на мембране или фильтре, анализируется затем любым аналитическим методом либо с применением предварительной экстракции с фильтра, либо без нее. При анализе воды одним из наиболее часто прослеживаемых компонентов является хлорофилл, находящийся в водорослях большинства водоемов. Число водорослей и количество хлорофилла, присутствующие в водоеме, указывают на степень плодородности и обогащения питательными веществами. Стандартная методика состоит в том, чтобы отфильтровать большой объем воды (обычно от 500 мл до 2 л), экстрагировать подходящим растворителем хлорофилл и затем с помощью спектрофотометрии измерить его концентрацию. Читатель, интересующийся подробностями этого метода, может обратиться к работам Стрикленда и Парсонса [212], а также Ветцеля и Ликенса [235]. Этот простой метод мембранной фильтрации поистине революционизировал океанографические и лимнологические исследования.

Мембранный фильтр может быть использован также для оценки наличия в воде определенного рода загрязнений [78]. Например, присутствие суспензированных окислов железа в котловой воде можно определить фильтрацией 1 л воды через мембраны с порами 0,45 мкм и последующим сравнением цвета мембраны со стандартной таблицей, дающей замеренную концентрацию окиси железа (в частях на миллион в пересчете на железо). Вполне различимые изменения в цвете можно получить при столь низкой концентрации железа, как 10 частей на миллион. Подобный тест применяется для анализа или оценки качества горючего для реактивных авиационных двигателей [78].

Для определения наличия бактерий в водах, используемых в замкнутом производственном цикле, в метод мембранной фильтрации было внесено некоторое изменение, а именно мембраны окрашивались красителем Понсо-S, который связывается с белковым материалом. Индикация на микробную загрязненность воды устанавливается приблизительно по степени покраснения испытываемой мембраны.

Более общие способы контроля за содержанием частиц в водах, используемых для промышленных целей, состоят в количественном измерении скорости забивания мембраны при пропускании через нее воды. В одном способе воду пропускают через мембрану при постоянном давлении и измеряют скорость потока во времени; уменьшение скорости потока пропорционально концентрации частиц. В другом способе воду фильтруют при постоянной скорости потока и следят за тем, как возрастает давление, необходимое для поддержания этой скорости. Полученное значение называют коэффициентом забивания.

11.11. УСТРОЙСТВА ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВ С ПОМОЩЬЮ МЕМБРАН

Синтетические полимерные мембраны представляют собой крайне необходимую составную часть сложных систем для введения пациентам лекарств с небольшой постоянной скоростью в течение длительных промежутков времени. Преимуществом такого введения лекарств является то, что их концентрация может при этом поддерживаться на соответствующем лечебном уровне в крови и тканях без случайных подъемов до потенциально токсического уровня, как это иногда бывает при приеме лекарств через определенные интервалы. Пионером в производстве устройств для контролируемого мембранами введения лекарств была «Альза корпорейшн» (адрес: USA, 950 Page Mill Road, Palo Alto, CA 94303) [98, 218]. Одним из таких устройств, разработанных этой компанией, является «мини-осмотический насос» (рис. 11.15). Он имеет вид капсулы длиной 2,5 см, диаметром 0,6 см и полным внутренним объемом 200 мкл. Каждый насос заключает в себе: 1) инертную, водонепроницаемую камеру с лекарством, имеющую узкое отверстие для сообщения с внешней средой; 2) вторую камеру, отделенную от первой эластичной водонепроницаемой перегородкой и снабженную жесткой внешней водопроницаемой мембраной; 3) водорастворимую соль, помещенную во вторую камеру. Вода диффундирует через внешнюю мембрану в солевую камеру, объем которой увеличивается из-за частичного растворения соли. Увеличение объема камеры с солью приводит к уменьшению объема камеры с лекарством, в результате чего последнее выдавливается через отверстие наружу. Скорость поступления воды равна скорости истечения лекарства. Надлежащий подбор размера отверстия, концентрации лекарства и содержания соли может обеспечить равномерное поступление лекарства в течение длительных отрезков времени. Основываясь на этом принципе и используя синтетические полимер-

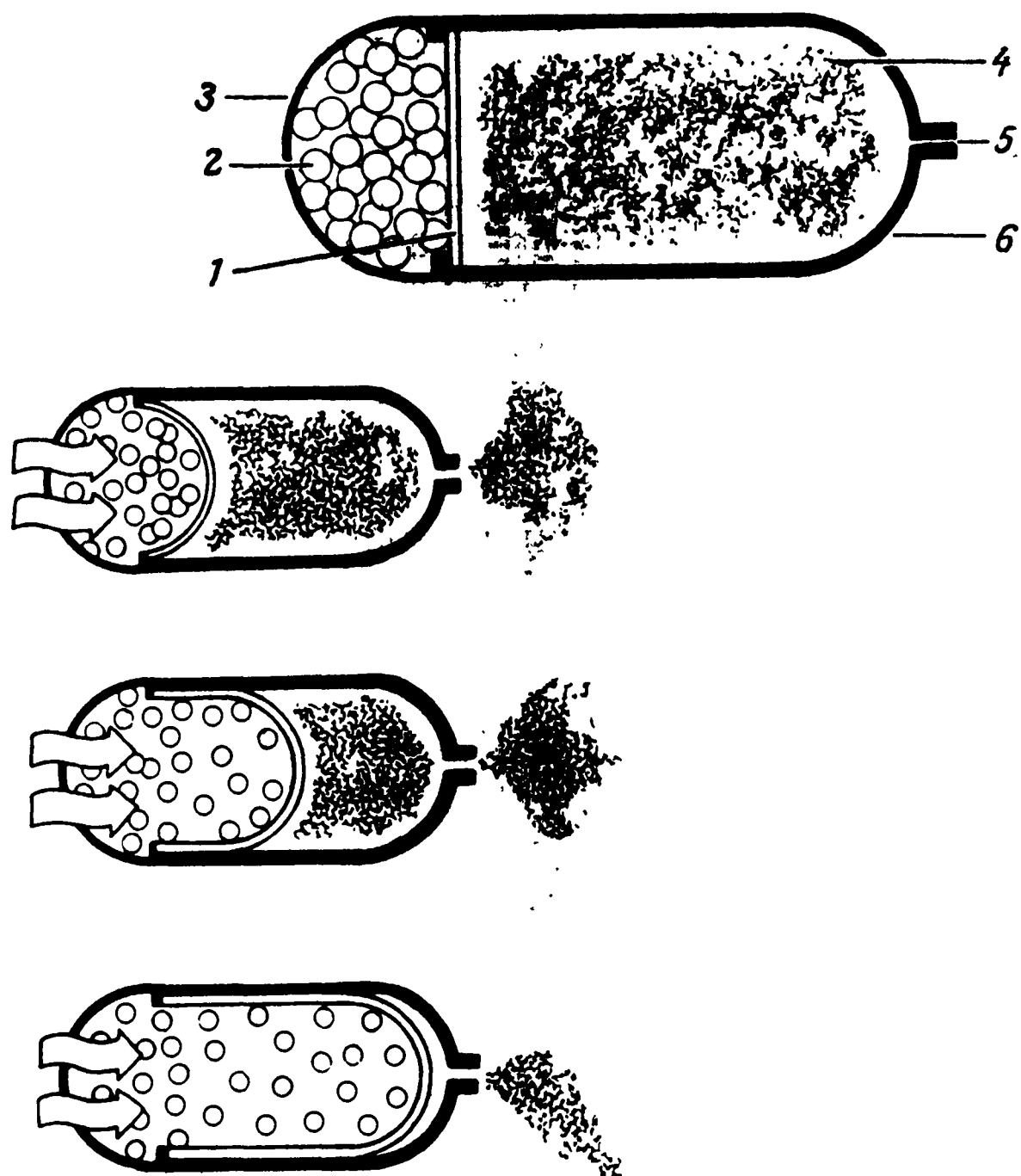


Рис. 11.15. Устройство и действие контролируемого мембраной осмотического насоса. (Из работы [98].) Вода диффундирует через водонепроницаемую мембрану, объем солевой камеры увеличивается, и лекарство вытесняется через узкое отверстие. Скорость поступления лекарства может строго контролироваться. 1 — эластичная водонепроницаемая перегородка; 2 — емкость с солью; 3 — водопроницаемая мембрана; 4 — емкость для лекарства; 5 — отверстие для выпуска лекарства; 6 — водонепроницаемый корпус из полимера.

ные мембраны в качестве главного компонента, фирма «Альза» разработала целый ряд различных устройств для практического применения [98, 152].

11.12. ЭЛЕКТРОДНЫЕ ЗОНДЫ, СОДЕРЖАЩИЕ МЕМБРАНЫ

Полупроницаемые мембраны находят широкое применение при конструировании селективных электродных зондов, которые служат для анализа определенных химических компонентов. Наиболее известным электродом этого типа является стеклянный электрод, используемый для измерения рН, однако существует широкий набор других электродных зондов. Одна

из разработок этого типа представляет собой биоселективный мембранный зонд, в котором для отделения суспензии живых микроорганизмов от внутреннего электрода используется перегородка из микропористой или плотной полимерной мембраны [173]. На рис. 11.16 показан пример такого устройства, в котором бактериальная культура, содержащая фермент L-глутаминазу, производящий аммиак из глутамина, используется для специфического анализа на L-глутамин. Бактериальная культура *Micrococcus flavus* находится между внешней диализной мембраной (или микропористым мембранным фильтром) и внутренней газопроницаемой мембраной. Когда глутамин диффундирует через внешнюю мембрану, бактерии начинают продуцировать аммиак, который диффундирует через внутреннюю мембрану и обнаруживается специальным электродом, чувствительным к аммиаку. Объем суспензии бактериальных клеток, используемый при этом, составляет 10—15 мкл при общем

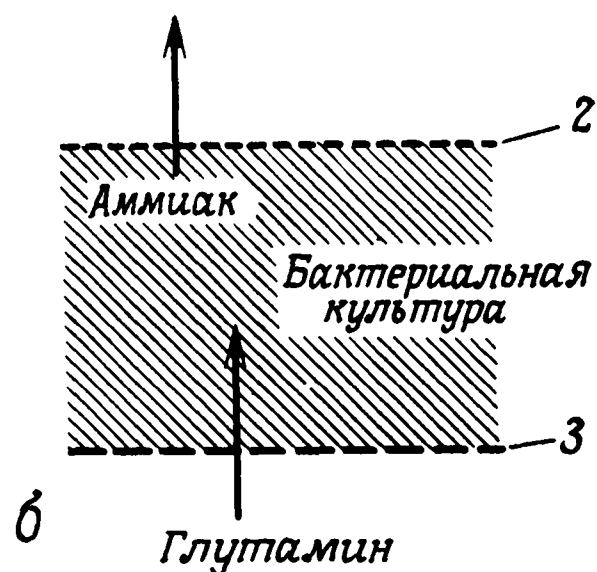
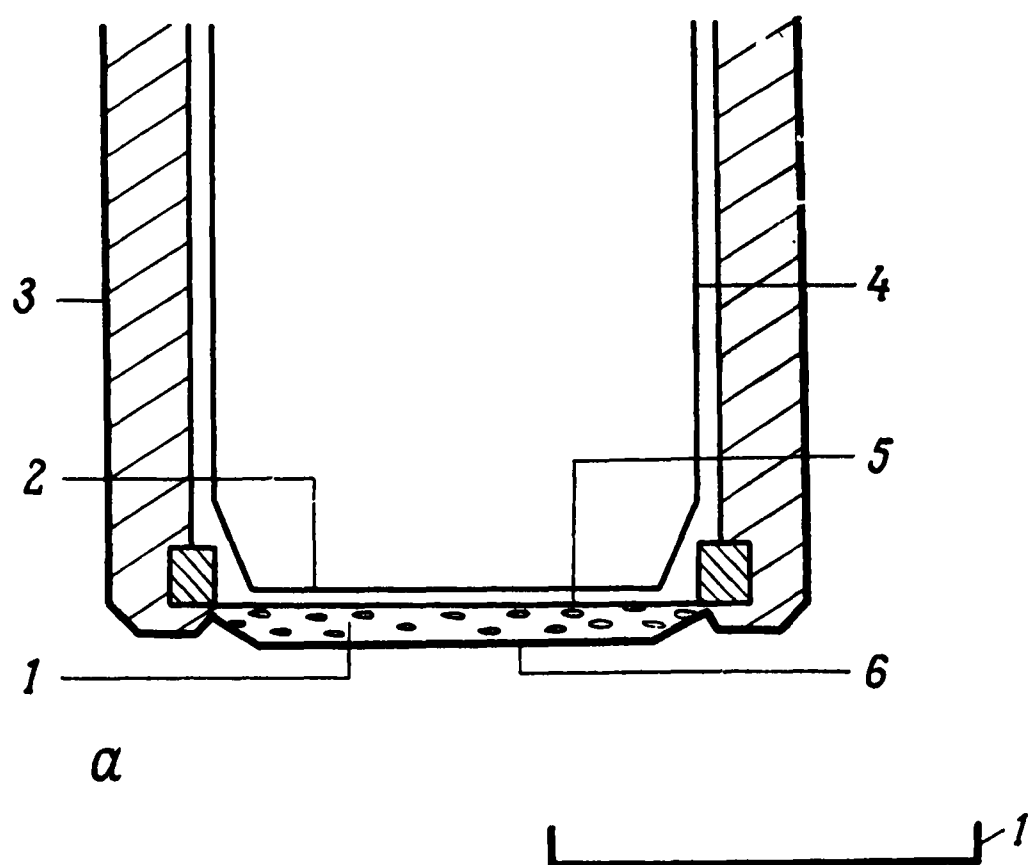


Рис. 11.16. Применение мембран в биологическом электроде, используемом для определения концентрации глутамина. (Из работы [73].) а — расположение мембран и составляющие электрода; 1 — бактериальная культура; 2 — внутренний электрод; 3 — пластмассовый стакан; 4 — комбинированный рН-электрод; 5 — газопроницаемая мембрана; 6 — ультрафильтрационная мембрана; б — определение количества глутамина; глутамин диффундирует в бактериальную культуру, где превращается в аммиак; аммиак диффундирует к внутреннему аммоний-специфическому электроду; была использована культура бактерий *Micrococcus flavus*; 1 — комбинированный рН-электрод; 2 — газопроницаемая мембрана; 3 — ультрафильтрационная мембрана.

числе клеток 10^8 — 10^9 . Клеточная масса из центрифугированной культуры распределяется по поверхности внутренней мембраны, после чего покрывается верхней мембраной. При осторожном обращении такая мембрана остается активной в течение нескольких недель или больше. Штамм *M. flavus* достаточно селективен на L-глутамин и может использоваться для измерения его концентрации даже в такой сложной смеси, как сыворотка человеческой крови. Другие случаи биоселективного зондирования бактериальных, растительных и животных тканей с помощью мембран рассмотрены в работе [173].

11.13. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе было описано использование мембранных фильтров в ряде отраслей биомедицины. Мы показали, что мембранные фильтры находят широкое применение в биомедицинских исследованиях как в своей обычной роли в качестве фильтрующих, так и в менее привычных ролях, а именно в качестве подложек при изучении белков и нуклеиновых кислот. Возможно, одна из наиболее широких областей применения мембранных фильтров связана с количественным определением радиоактивных веществ с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика, хотя в некоторых случаях, оказывается, лучше использовать стекловолоконные фильтры. Важным достижением в области молекулярной биологии стало применение мембран из нитроцеллюлозы для гибридизации нуклеиновых кислот. Без разработки методов гибридизации с помощью мембранных фильтров было бы значительно задержано развитие технологии рекомбинантных ДНК.

Отсюда можно извлечь один урок. Нитроцеллюлозные мембраны, использованные для изучения гибридизации нуклеиновых кислот, были изобретены вовсе не для этой цели. Они долгие годы применялись для других целей и, к счастью, оказались доступными в тот момент, когда исследователи искали новые подходы к этой проблеме. Никакого систематического изучения мембран для гибридизации нуклеиновых кислот проведено не было. Возможно, существуют мембраны, которые лучше подходят для этой цели. К сожалению, выпуск мембранных фильтров — процесс настолько сложный, что исследователи, стремящиеся улучшить соответствующие методы, находятся в полной зависимости от производителей мембран. Вряд ли такое положение можно назвать удовлетворительным. Идеальный путь разработки новых методов состоит в том, чтобы исключить частнособственнические соображения. Торговые интересы должны вступать в силу лишь после того, как метод

будет проверен во всех своих аспектах. Однако в области мембранной технологии вряд ли можно достичь такого идеального состояния, поскольку исследователи не производят своих собственных мембран. Были предприняты специальные исследования, чтобы разработать мембраны, которые лучше подходили бы для электрофореза белков, чем те, которые имеются в продаже. Аналогичные исследования можно было бы выполнить и в других областях, в которых находят применение мембранные фильтры. Единственно возможный путь, который позволил бы провести такие исследования должным образом, состоит в сотрудничестве независимого исследователя и производителя мембранных фильтров. Научный работник мог бы представить обоснованные требования, а изготовитель мог бы дать материал для испытаний. Этим путем могли бы развиваться как фундаментальные исследования, так и технология изготовления мембранных фильтров.

Глава 12

Анализ вирусов, содержащихся в воде

12.1. ВВЕДЕНИЕ

Вирусы намного меньше бактерий и в отсутствие адсорбции должны проходить через поры мембран, используемых обычно при фильтрации более крупных частиц. Мембраны, которые способны механически (стерически) задерживать вирусы, имеют размеры пор того же порядка, что и ультрафильтры. Однако при необходимости фильтрации больших объемов воды ультрафильтры забиваются слишком быстро, так что ими нельзя долго пользоваться. Для удаления вирусов из больших объемов, как, например, в случае проведения контроля по загрязнению воды, широко используются мембраны с порами бактериальных размеров. Несмотря на то что у этих мембран поры больше, чем размеры вирусных частиц, с их помощью можно выделять вирусы, которые адсорбируются на матрице мембраны. Действительно, поскольку толщина мембранных фильтров составляет примерно 5000 вирусных диаметров, они действуют по отношению к вирусам отчасти и как «глубинные» фильтры, хотя их эффективность по сравнению с истинными глубинными фильтрами довольно низка. Соответствующим подбором условий фильтрации, главным образом рН воды, можно увеличить задерживающую способность мембраны и удалить по существу все вирусные частицы из водной пробы, используя мембраны с размером пор порядка 0,45 мкм. Вирусные частицы, адсорбированные на мембране, могут быть затем десорбированы для их идентификации или подсчета. Применительно к вирусам мембранную фильтрацию наиболее часто используют при проведении анализа питьевой воды; поэтому цель настоящей главы состоит в том, чтобы показать, как мембранная технология используется в этой области. Материал этой главы хорошо освещен в обзоре Биттона [29].

12.2. ТИПЫ ВИРУСОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В ВОДЕ

Вирусы, инфицирующие желудочно-кишечный тракт человека и теплокровных животных, выделяются с фекалиями и могут попадать в воду при загрязнении ее сточными водами. К таким вирусам относятся: полиовирусы, вирусы Коксаки, эховирусы, аденовирусы, реовирусы, ротавирусы, вирус гепатита А (инфекционного гепатита) и агенты, подобные парвовирусам, такие, как агент Норуолка. Из них наиболее важными с точки зрения болезней, передающихся посредством воды, являются полиовирусы и вирус инфекционного гепатита.

Поскольку вирусы являются внутриклеточными паразитами, их нельзя обнаружить с помощью питательной среды, как это делается в случае бактерий. Для их обнаружения необходимо использовать культуру тканей с линией клеток, соответствующей данному вирусу. Главная трудность при выращивании вирусов в культурах ткани состоит в том, что присутствующие в пробе бактерии могут легко размножиться и уничтожить эту культуру. Поэтому, чтобы предотвратить разрастание бактерий, к питательной среде добавляют антибиотики. Методы выращивания вирусов на культуре ткани носят достаточно сложный и специальный характер, и в дальнейшем мы их не будем обсуждать, тем более, что в этой области нет недостатка в информации, которую при необходимости читатель может найти в соответствующей литературе.

Из-за большого числа существующих типов вирусов, а также вследствие сложности их выращивания мы не имеем, очевидно, возможности проверить питьевую воду или воду другого происхождения на все потенциально существующие вирусы. С такой же проблемой мы столкнулись, когда имели дело с патогенными бактериями (гл. 10). При этом, для того чтобы сделать вывод о возможном наличии патогенных бактерий, можно было использовать бактерии-индикаторы, такие, как БГКП. К сожалению, вирусов-индикаторов не существует, поскольку вирусы в норме не являются частью микрофлоры кишечного тракта, и, следовательно, отсутствует постоянное выделение вируса, который можно было бы использовать как индикатор вирусного загрязнения. Почему тогда не использовать для этой цели бактерии-индикаторы вроде БГКП? Именно это в настоящее время и делают, но возникают сомнения, всегда ли бактерии-индикаторы надежно свидетельствуют о присутствии вируса. Дело в том, что вирусы с их малыми размерами и отсутствием у них клеточной структуры намного более устойчивы в воде, чем бактерии. Они также более устойчивы к хлорированию и другим процессам, используемым для того,

чтобы сделать воду пригодной для питья. Таким образом, существует большая вероятность того, что в воде могут оказаться вирусы, несмотря на то что она была признана удовлетворительной согласно тесту на БГКП.

Именно главным образом потому, что БГКП оказались ненадежными как индикаторы наличия вирусов в воде, и были разработаны методы прямого определения вирусов. Эти методы, описанные в 14-м и 15-м изданиях «Стандартных методов проверки воды и сточных вод» [3], все еще считаются предварительными; они не имеют никакого юридического значения, и их следует рассматривать в основном лишь как средство для изучения патогенных вирусов в воде.

Помимо контроля источников воды на наличие вирусов существует и другая область, в которой необходимо применять фильтрацию для выделения вирусов из воды. Речь идет о приготовлении препаратов, не содержащих вирусов, например инъекционных растворов (см. гл. 7). Хотя вирусы не играют такой роли в заражении воды, как бактерии, для некоторых материалов или процессов удаление вирусов может стать необходимым. Поэтому, даже независимо от проблемы загрязнения воды, очень важно представлять себе, как мембраны и микрофильтры удаляют вирусы из воды.

12.3. МЕТОДЫ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСОВ

Концентрации вирусов в воде намного ниже (возможно, в 10 000 или в 100 000 раз), чем концентрации бактерий. Таким образом, хотя мы можем провести испытание питьевой воды на БГКП, используя пробы объемом 100—200 мл, столь малые объемы, если не считать очень сильно загрязненных вод, недостаточны для определения вирусов. Фильтрацию для этого нужно осуществлять с большими объемами воды, и основная проблема, которая здесь возникает, состоит в том, как проводить процесс с такими большими объемами воды. Здесь, согласно Биттону [29], существует ряд возможных методов:

1. Адсорбция на микрофильтрах с последующей десорбцией с них (этот вопрос мы подробно рассмотрим в данной главе).

2. Адсорбция и осаждение с помощью гидроокиси алюминия.

4. Коагуляция сульфатом аммония или другими агентами, осаждающими белки.

4. Удаление воды из пробы через диализную мембрану в полиэтиленгликоль (гидроэкстракция; см. [3]).

5. Ультрафильтрация с использованием мембран в виде листов, дисков или полых волокон (см. гл. 13).

6. Использование водно-полимерных двухфазных систем (жидкостная экстракция).

Если не считать первого, ни один из этих методов не подходит для анализа очень больших объемов воды. Ультрафильтрация страдает от быстрого забивания мембран, методы осаждения недостаточно эффективны при низких концентрациях вирусов, а гидроэкстракцию можно использовать лишь при работе с малыми объемами. Мембранная фильтрация либо сама по себе, либо в сочетании с глубинными фильтрами, импрегнированными полимерами, представляет собой один из наиболее пригодных методов концентрирования вирусов.

12.4. ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОЦЕССОВ АДСОРБЦИИ И ДЕСОРБЦИИ НА МЕМБРАНАХ И ФИЛЬТРАХ

Мы часто отмечали, что фильтры и мембраны адсорбируют макромолекулы и частицы, много меньшие, чем номинальный размер пор. В гл. 11 мы рассмотрели применение нитроцеллюлозных мембран для адсорбции белков и нуклеиновых кислот. Одна из основных проблем при использовании мембран, калиброванных по размеру пор, для определения размеров вирусных частиц заключается в том, что во многих случаях вирусы не могут пройти через мембрану из-за адсорбции, даже когда размеры пор много больше размера вируса. Подобная адсорбция бактерий на мембранных фильтрах рассматривалась нами в разд. 11.6.

Какие же силы участвуют при адсорбции малых частиц на материале мембранного фильтра? Хотя здесь имеют место слабые взаимодействия типа вандерваальсовых сил, гидрофобных взаимодействий и водородных связей [29], главную роль в связывании играют, по-видимому, электростатические силы. Поверхности мембранных фильтров обычно заряжены отрицательно, так что положительно заряженные частицы будут сильно связываться. Вирусы же, как правило, при нейтральных значениях рН заряжены отрицательно и не адсорбируются. Однако, если рН становится меньше 4, матрица мембраны перезаряжается; она становится положительно заряженной и начинает адсорбировать вирусные частицы (рис. 12.1). Таким образом, если водную пробу подкислить и затем профильтровать через мембрану, то практически все вирусные частицы свяжутся с мембраной. Добавление катионов, особенно многовалентных, таких, как алюминий, увеличивает эффективность перезарядки матрицы мембраны; добавление хлорида алюминия даже в столь низкой концентрации, как

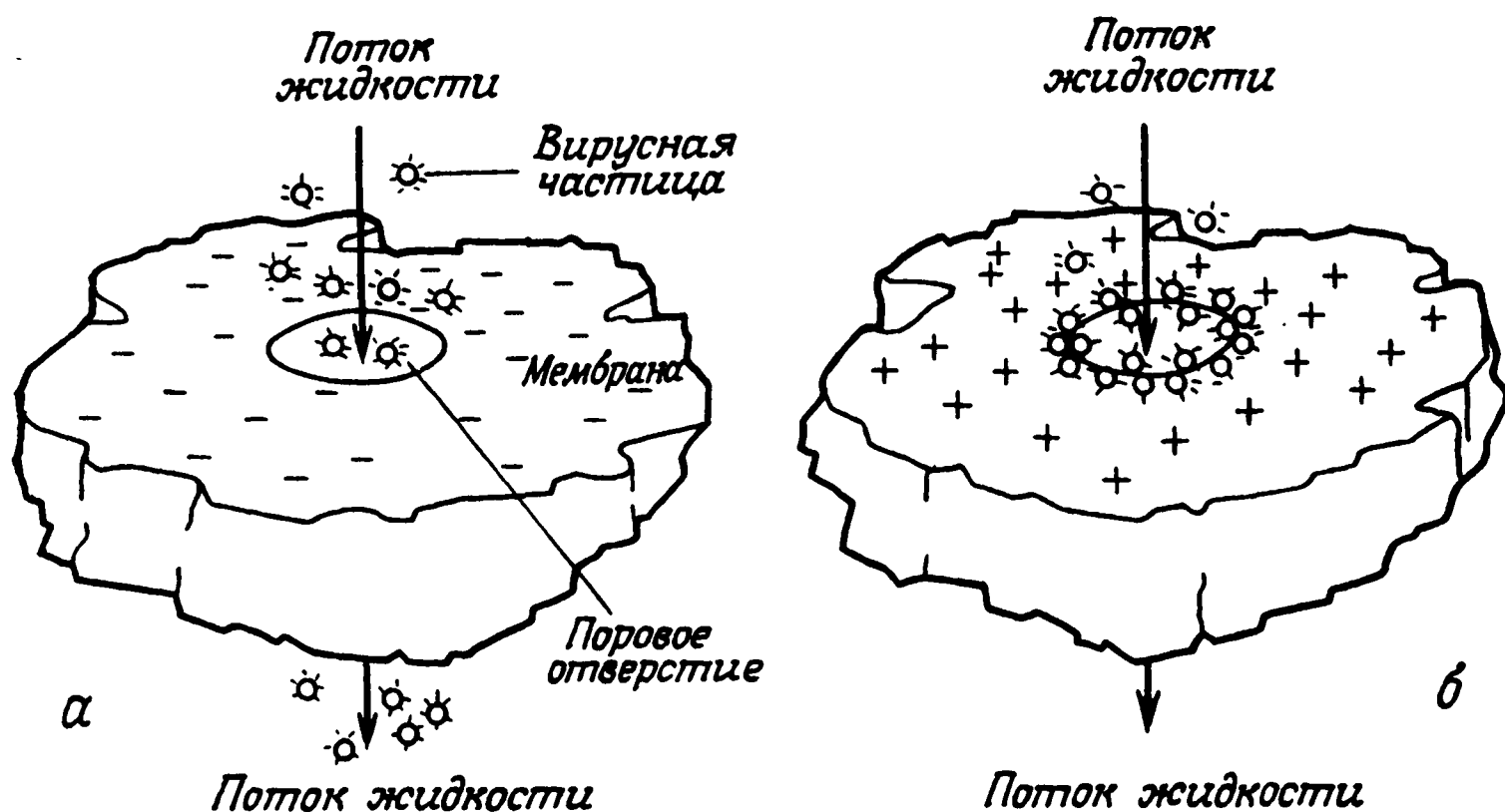


Рис. 12.1. Влияние знака заряда поверхности матрицы мембраны или фильтра на прохождение вирусов через пору. *а* — как вирусные частицы, так и поверхность матрицы заряжены отрицательно; вирусные частицы проходят через пору; *б* — поверхность матрицы стала положительно заряженной, после того как снизили рН; вирусные частицы адсорбировались на поверхности пористого материала.

0,0005 М, может значительно увеличить эффективность задержки вирусов. Чтобы провести количественный анализ вирусов, их нужно вначале десорбировать с мембраны; для этого увеличивают рН до значений больше 9, при которых поверхности мембраны и вирусов становятся заряженными одноименно (отрицательно) и вирусные частицы десорбируются¹.

Таким образом, чтобы удалить вирусы из воды и провести затем их количественный анализ, нужно выполнить следующие операции: подкислить воду, произвести фильтрацию через мембрану и затем десорбцию связанного вируса небольшим количеством элюирующего раствора с $\text{pH} > 9$. Полученный элюат затем нейтрализуют и проверяют на присутствие вируса, используя культуру тканей или проводя исследования на подопытных животных. Этот метод позволяет увеличить концентрацию вирусов от одного вируса на 400 л воды до одного вируса на объем, меньший чем 1 л. Повторив описанные выше операции концентрирования (фильтрацию и десорбцию), можно довести этот объем воды до нескольких миллилитров,

¹ Рассуждение автора здесь принципиально верно лишь для некоторых типов вирусов и материалов мембран (или фильтров). Во многих случаях адсорбция вирусов на матрице мембраны определяется главным образом силами неэлектростатической природы (например, гидрофобными взаимодействиями или вандерваальсовыми силами), и лишь стадия десорбции определяется практически лишь одними силами электростатического отталкивания между одноименно заряженными поверхностями вирусов и пор мембран.— *Прим. ред.*

значительно увеличив тем самым чувствительность количественного анализа. Большинство кишечных вирусов выдерживают, по крайней мере в течение нескольких минут, характерные для этого метода сильные изменения рН. Заметим, что аналогичный метод применялся и для концентрирования бактерий, содержащихся в воде (см. разд. 10.8).

Для адсорбции вирусов кроме мембран использовались также разные глубинные фильтры, и хотя (судя по литературе) они имеют различные эффективности, упомянутые выше «Стандартные методы» [3] не дают рекомендаций относительно того, какой из фильтров следует здесь предпочесть. Для первой стадии фильтрации используются следующие типы пористых материалов:

1. *Фирма «Миллипор»*. Последовательно установленные дисковые фильтры и мембраны из нитроцеллюлозы, размер пор 8,0 и 1,2 мкм, диаметр 293 мм.

2. *Фирма «Кокс инструмент дивижн»*. Тип М-780, комплект АА дисков из стекловолокна с асбестом и эпоксидной смолой, размер пор 5 и 1,0 мкм, диаметр 267 мм.

3. *Фирма «Болстон»*. Трубка, заполненная стеклянными волокнами, скрепленными эпоксидной смолой, длина 17,8 см, размер пор 8,0 мкм.

4. *Фирма «Коммерциал филтер дивижн, карборундум Ко»*. Фильтр-патрон на основе тканого стекловолокна, размер пор 3,0 мкм, длина 25,4 см, действующий в комплекте с фильтром из стекловолокна с асбестом и эпоксидной смолой (диаметр 127 мм, размер пор 5,0 и 1,0 мкм) производства фирмы «Кокс инструмент дивижн».

5. *Фирма «Филтерит корпорейшн»*. Импрегнированный стекловолокном с меламином фильтр-патрон из бумаги с эпоксидной смолой, размер пор 0,25 или 0,45 мкм, длина 25,4 см.

Для второй стадии фильтрации рекомендуется использовать дисковые фильтры из стекловолокна с асбестом и эпоксидной смолой (размер пор 5,0, 1,0 и 0,45 мкм, диаметр 47 мм) производства фирмы «Кокс инструмент дивижн».

Методики для концентрирования вирусов первоначально были проверены на полиовирусах. В этих опытах определенные небольшие количества полиовируса были добавлены к обычной питьевой воде, которая затем была обработана и подвергнута анализу. Якубовский и др. [116] использовали для первой стадии концентрирования фильтры фирмы «Болстон», а на второй — дисковые фильтры фирмы «Кокс»; после фильтрации 380 л водной пробы с низким содержанием вируса было достигнуто выделение около 50 %. В табл. 12.1 приведены данные, полученные в нескольких разных экспериментах.

Фарра и др. [73] исследовали гофрированные мембраны и

Таблица 12.1. Выделение полиовирусов из больших объемов водопроводной воды [116]

Номер опыта	Исходное содержание вирусов, число бляшкообразующих единиц	Выделение вирусов, число бляшкообразующих единиц	Выделение вирусов, %
1	153	74	48
2	95	54	57
3	95	49	52
4	30	15	50
5	19	8	42

Приведено исходное содержание вирусов в 380 л воды. Фильтрация проводилась через трубки фирмы «Болстон» с порами 8 мкм.

фильтры, изготовленные различными изготовителями, пытались уменьшить забивание пор и предотвратить концентрирование посторонних органических веществ, которые затрудняют вторую стадию фильтрования. Были испытаны следующие пористые материалы: нитрат целлюлозы (фирма «Миллипор», тип НА), эпоксистекловолокно (фирма «Кокс», комплект АА), акрилонитрил-поливинилхлорид (фирма «Гелман», Акропор), импрегнированная меламином эпоксибумага (фирма «Филтерит») и сотовидное стекловолокно (фирма «Карборундум»). При начальной разработке этого метода Фарра и др. использовали фильтры в виде плоских дисков, но их забивание создавало существенные трудности, в результате чего первая стадия фильтрации 1900 л воды занимала свыше 6 ч. Применение фильтр-патронов позволило значительно увеличить фильтрующую поверхность и уменьшить забивание. Однако, как показано на рис. 12.2, из испытанных фильтр-патронов некоторые забивались намного быстрее, чем другие, причем модуль фирмы «Филтерит» обнаружил явное превосходство. Использование его для первой стадии фильтрации привело к тому, что забивания по существу не наблюдалось. Однако следует заметить, что в этом модуле в действительности располагается не мембранный фильтр, а импрегнированная пластмассой бумага (см. выше). Другая трудность, а именно накопление органических веществ, препятствующих второй стадии фильтрации, была преодолена тем, что на этой второй стадии вообще не проводили фильтрацию в обычном смысле. Стадия повторного концентрирования состояла в обработке элюата, полученного от первой стадии, хлопьевидной гидроокисью алюминия с отделением полученных хлопьев на дисковых фильтрах.

Довольно подробно процесс десорбции адсорбированных вирусов изучили Фарра и Битто [72]. Они показали, что в этом процессе существенную роль играют значения изоэлектриче-

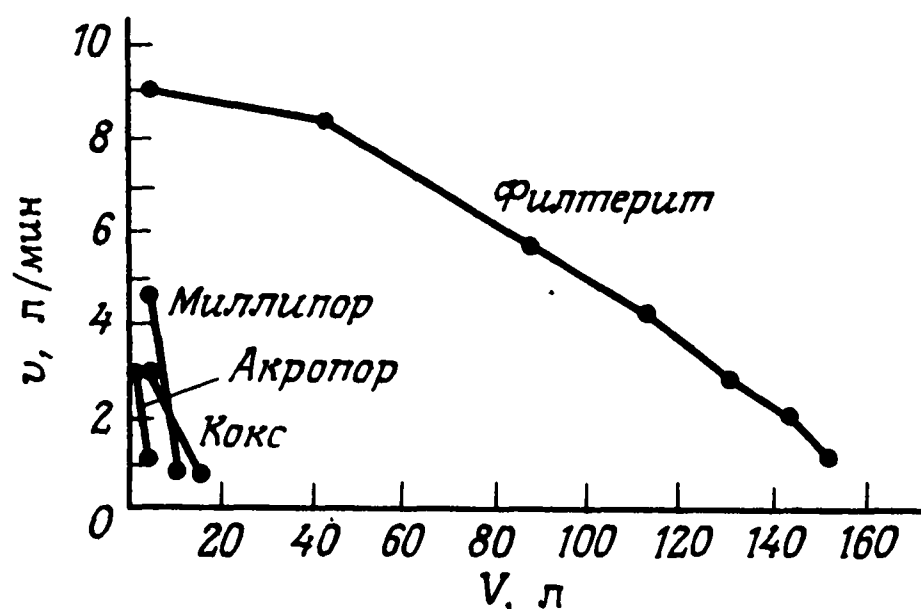


Рис. 12.2. Сравнение скоростей забивания нескольких типов пористых материалов при работе в условиях эффективного удаления вирусов. Содержащая вирусы водопроводная вода фильтровалась при рН 3,5; v — скорость забивания; V — объем водопроводной воды, прошедшей через фильтр. (Из работы [73].)

ских точек веществ, используемых при щелочной десорбции полиовирусов. При стандартном значении рН, равном 9, кислые аминокислоты и органические кислоты плохо подходят для десорбции, а лучше использовать нейтральные и основные аминокислоты. Кроме того, хорошими элюентами являются белковые растворы, такие, как мясной экстракт благодаря главным образом высокому содержанию в них нейтральных и основных аминокислот.

В заключение заметим, что Блок и др. [31] описали метод концентрирования полиовирусов с помощью мембран из альгината алюминия. Эти мембраны (см. разд. 3.8) обладают тем уникальным преимуществом, что, будучи растворимыми в водном цитрате натрия, не растворяются в воде. Таким образом, после того как водная проба была пропущена через мембрану, последнюю можно растворить в небольшом объеме раствора цитрата натрия, выделив в результате вирусный концентрат. Мембраны из альгината алюминия производит отделение фирмы «Сарториус» в Гёттингене (а не фирма «Сарториус» в США). Эти мембраны имеют низкую эффективность выделения и плохую воспроизводимость результатов; однако выделение на них можно увеличить, если добавить в пробу хлористый алюминий до 0,0002 М. Кроме того, мембраны из альгината создают определенные трудности при обращении с ними, поскольку они ломкие, допускают лишь малые скорости фильтрации и могут эффективно использоваться только с пробами малых объемов. В настоящее время эти мембраны, по-видимому, не имеют преимуществ перед другими фильтрами, рассмотренными выше.

12.5. СПЕЦИАЛЬНАЯ МЕТОДИКА ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ ИЗ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

Для анализа питьевой воды на содержание в ней вирусов минимальный рекомендуемый объем пробы составляет 400 л. Однако если концентрация вирусов столь низка, как 1—2

инфекционные единицы на 400 л, то для надлежащего количественного анализа вирусов в водной пробе может потребоваться и 2000 л. В целом процедура фильтрации на первой стадии состоит в прокачке воды под давлением через жидкостной *дозатор* — прибор, добавляющий с определенной скоростью соляную кислоту, чтобы снизить рН до 3,5. Кроме того, если в воде содержится остаточный хлор, что обычно имеет место при работе с окончательно готовой питьевой водой, то для удаления этого хлора нужно добавлять также с определенной скоростью тиосульфат натрия. Концентрации этих добавок устанавливаются с таким расчетом, чтобы конечная концентрация оказалась на требуемом уровне. На рис. 12.3 приведена общая схема первой стадии процесса фильтрации.

После фильтрации определенного объема пробы вирусы могут быть десорбированы. Это можно осуществить непосредственно в полевых условиях или в лаборатории, поскольку фильтр может быть стерильно извлечен и в охлажденном виде в стерильной упаковке доставлен в лабораторию. Десорбция может быть проведена либо 0,05 молярным глициновым буфером при рН 11,5, либо 3 %-ным мясным экстрактом при рН 9,0. Хотя глициновый буфер может десорбировать более эффективно, некоторые вирусы инактивируются при соответствующих этому буферу высоких значениях рН. Инактивацию вирусов можно свести к минимуму, если десорбцию проводить быстро. Десорбирующий раствор (около 1 л) помещают в сосуд, связанный с фильтрующим устройством, и пропускают жидкость через фильтр под давлением с такой скоростью, чтобы вся она прошла за 1—2 минуты. Элюат собирают в стерильный сосуд и, как только процесс десорбции будет закончен, доводят рН до 7,5—9,5, используя глициновый буфер с рН 1,5. Чтобы избежать инактивации вируса, всю операцию десорбции и нейтрализации следует завершить менее чем за 5 минут.

На второй стадии первоначально полученный вирусный концентрат концентрируют снова. Опять доводят рН до 3,5 глициновым буфером с рН 1,5 и добавляют 0,05 М раствор хлористого алюминия до конечной концентрации 0,0005 М. Подкисленную пробу фильтруют затем через фильтры фирмы «Кокс» (см. разд. 12.4) со скоростью не более 130 мл/мин. Чтобы удалить избыток ионов алюминия, фильтры промывают 25 мл 0,14 М раствора хлорида натрия, после чего десорбируют вирус 7 миллилитрами глицинового буфера с рН 11,5. Как и прежде, десорбцию проводят медленно и элюат собирают в стерильный сосуд. С помощью глицинового буфера с рН 1,5 сразу же доводят рН до 7,5—9,5. Проводят повторную десорбцию 7 миллилитрами глицинового буфера с рН 11,5 и два нейтра-

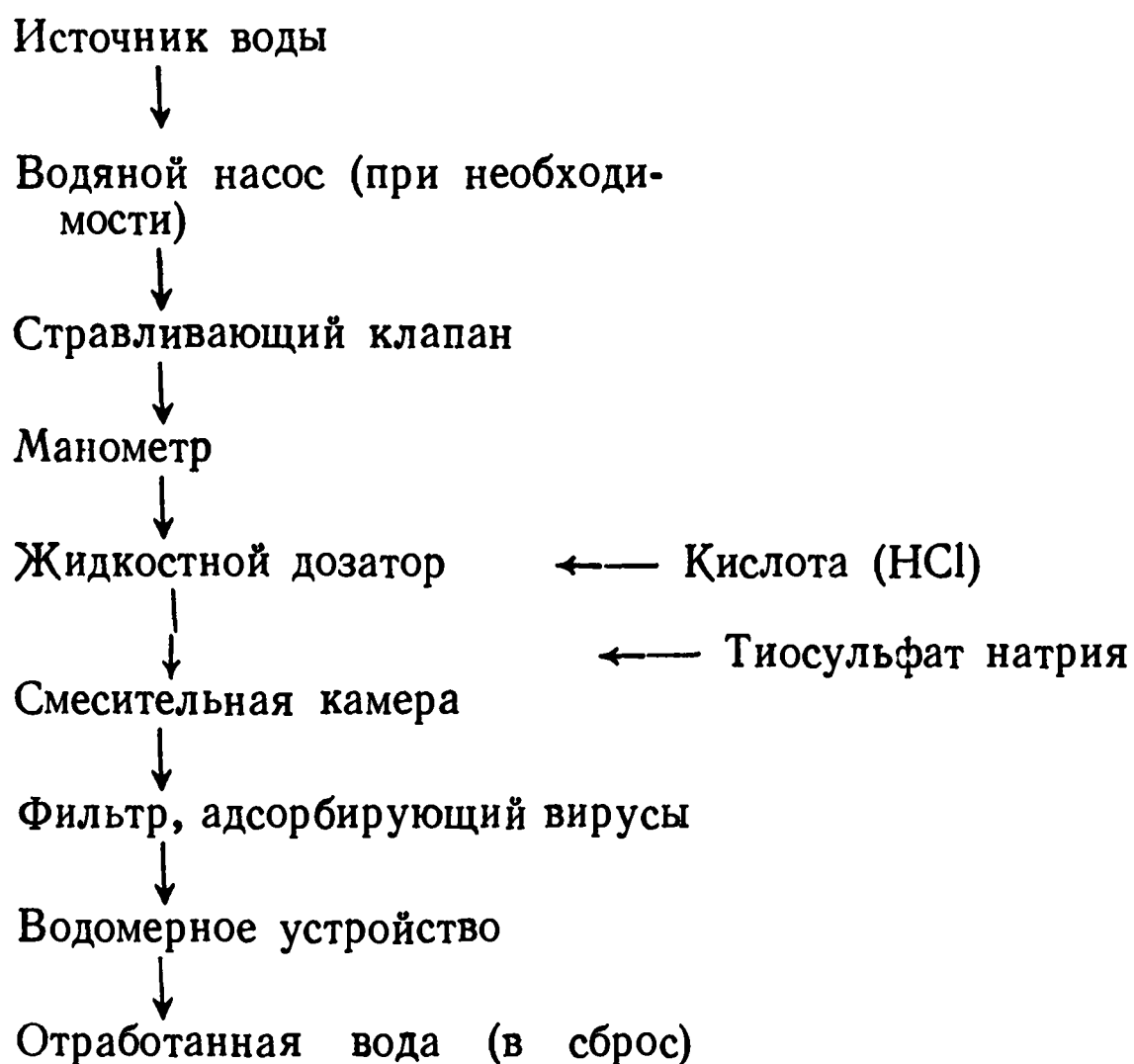


Рис. 12.3. Схема первой стадии концентрирования вирусов.

лизованных элюата объединяют. Как и на 1-й стадии, весь процесс, включая операции адсорбции — десорбции и инактивации должен быть закончен в течение 5 минут. После этого добавляют к элюату некоторое количество бульона (который действует как стабилизатор) и антибиотиков, и этот вирусный концентрат хранят замороженным до тех пор, пока его можно будет проанализировать на культуре тканей или на подопытных животных. Дальнейшее концентрирование может быть проведено при необходимости с помощью кислотного осаждения.

Более подробное описание рассмотренного выше метода и детали анализа на содержание вирусов читатель может найти в «Стандартных методах» Американской ассоциации здравоохранения [3].

Лишь Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала официальный вирусологический стандарт для питьевой воды [238]. Стандарт ВОЗ устанавливает, что в 10 л воды не должно содержаться более 10 инфекционных единиц. Пэймент и Трудел [166] провели исследование нескольких мембранных и стекловолоконных микрофильтров относительно того, насколько высока их эффективность адсорбции вирусов и устойчивости к забиванию. Был сделан вывод, что 47-миллиметровый крупнопористый стекловолоконный микрофильтр (D79) фирмы «Джонс-Мэнвилл» в комплекте с очень мелким стеклянным фильтром (D39) той же фирмы позволяет достичь очень высокой степени удаления вирусов (около 90 %) из 10 л воды (количество, предписанное стандартом ВОЗ). В зави-

симости от исследуемой воды эта комбинация фильтров всегда обеспечивает фильтрацию 20 л воды, а в некоторых случаях и 100 л. Если столитровые объемы должны фильтроваться регулярно (для получения статистически значимых чисел при счете вирусов), то можно использовать дисковые фильтры указанных выше марок диаметром 142 мм. Пэймент и Трудел полагают, что эту комбинацию фильтров можно применять вместо более сложной комбинации фильтр-патронов, рекомендованных Американской ассоциацией здравоохранения [3], как показано на рис. 12.3. Такая комбинация позволяет пользоваться более простым оборудованием, чем то, которое требуется для фильтр-патронов. Однако следует заметить, что фильтр-патроны фирмы «Филтерит» могут быть в соответствии со «Стандартными методами» использованы вновь, что значительно снижает финансовые затраты по их эксплуатации (когда скоро для них было уже приобретено специальное оборудование). Кроме того, читателя необходимо проинформировать о том, что фирма «Джонс-Мэнвилл» не производит теперь этих фильтров, их теперь выпускает фирма «Нуклепор» под теми же номерами по каталогу.

12.6. ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ФИЛЬТРОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ВИРУСОВ

Поскольку основными силами, заставляющими вирусы адсорбироваться на мембране или фильтре, являются электростатические, казалось разумным разработать пористый материал, несущий в нейтральной области рН вместо отрицательного положительный заряд. При этом необходимость в подкислении воды на стадии адсорбции вирусов могла бы быть исключена. Такие фильтры с положительно заряженной поверхностью были разработаны фирмами «АМФ Кюно» (фильтры Дзета-Плюс) и «Пол тринити микро» (N 66 Посидайн). Первый широко испытывался при анализе вирусов в питьевой воде [202, 203, 112].

Хоу и др. [112] испытывали положительно заряженные фильтры Дзета-Плюс для улавливания разных частиц, включая не только вирусы, но также бактерии, эндотоксин и частицы латекса. Фильтруя (при $pH > 7$, чтобы устранить положительный заряд на поверхности мембраны) латексные частицы различных размеров, эти авторы показали, что основной механизм извлечения частиц с диаметром меньше чем 1 мкм является электростатическим, а не ситовым, т. е. механическим (см. гл. 2). Поскольку положительно заряженные фильтры извлекают, кроме того, и макромолекулярные компоненты, такие, как

эндотоксин, они могут принести значительную пользу при приготовлении инъекционных растворов (см. гл. 7).

Для извлечения вирусов было тщательно испытано два сорта положительно заряженных фильтров (оба производства фирмы «АМФ Кюно»): Дзета-Плюс 50S (диски 47 мм диаметром) и Вирозорб 1MDS, поставляемые в виде фильтр-патронов с гофрированными листами размером $25,4 \times 7,6$ см. Дисковые фильтры Дзета-Плюс изготавливаются из ионообменных смол с добавкой целлюлозы и диатомовой земли, а фильтр-патроны с гофрированными листами изготовлены из двух идентичных слоев тонколистового материала, состоящего из стекловолокна с химически модифицированной поверхностью и целлюлозных смесей (номинальный размер пор 0,2 мкм). Собси и Гласс [203] сравнили эти пористые материалы с измененным по отношению к обычным фильтрам зарядом поверхности с фильтр-патронами Филтерит, которые, как было ранее показано [73], являются наиболее эффективными для извлечения вирусов. Адсорбция в устройствах Филтерит осуществляется при pH 3,5 в то время как фильтры с измененным зарядом могут использоваться при pH 7,5. Адсорбированные вирусы десорбировались как обычно глициновым буфером с pH 11,0. В табл. 12.2 сравниваются эффективности адсорбции вирусов этими двумя типами фильтрующих материалов; можно видеть, что фильтры Дзета-Плюс так же эффективны, как и устройства Филтерит, но обладают тем дополнительным преимуществом, что водную пробу теперь не нужно подкисливать. Собси и Гласс утверждают, что фильтры с измененным зарядом, такие, как фильтр-патроны Вирозорб, особенно перспективны, поскольку их большая фильтрующая поверхность обеспечивает высокие скорости пропускания и гидравлические нагрузки. Они доказывают также, что по сравнению с устройством Филтерит адсорбция на материалах Вирозорб и Дзета-Плюс в меньшей степени зависит от некоторых растворимых или коллоидных веществ, присутствующих иногда в водопроводной воде. Кроме того, вирусы могут быть десорбированы из этих пористых материалов с измененным зарядом более эффективно при pH 9,5, чем при pH 11,0, что, по-видимому, поможет избежать инактивации вирусов.

Поскольку описанные выше пористые материалы с измененным зарядом находятся лишь в экспериментальной стадии разработки, потребуется некоторое время, чтобы определить, обладают ли они достаточными преимуществами, чтобы заменить другие фильтры, в частности, рекомендуемые «Стандартными методами» [3].

Фильтры Пол Посидайн, выпускаемые как в виде патронов, так и в виде дисков, будучи изготовленными из модифицированного нейлона, отличаются по химическому составу от филь-

тров Дзета-Плюс. Изготовитель утверждает, что эти фильтры будут задерживать частицы с диаметром, близким к молекулярным размерам. Таким образом, эти фильтры могут в принципе использоваться и для удаления пирогенных веществ из инъекционных растворов и других фармацевтических препаратов. Заметим, что фирма «АМФ Кюно» также производит нейлоновый мембранный фильтр с измененным зарядом, названный Дзетапор и отличающийся, судя по технической документации, от фильтрующих материалов Дзета-Плюс, описанных Собси.

Таблица 12.2. Сравнение эффективности извлечения полиовирусов с помощью фильтров Филтерит и Дзета-Плюс 50S [203]

№ проб	Филтерит			Дзета-Плюс		
	Адсорбировано, %	Десорбировано, %	Выход, %	Адсорбировано, %	Десорбировано, %	Выход, %
1	53	7	4	86	35	30
2	73	70	51	88	50	44
3	40	56	22	75	62	46
4	47	62	29	94	96	90
5	99	79	78	92	77	71
6	82	100	82	82	45	37
7	88	82	72	89	54	48
8	97	47	46	100	59	59
9	91	90	82	100	57	57
10	99	80	79	98	65	64
11	96	40	38	97	42	41
12	97	54	52	82	59	48
13	99	58	57	100	47	47
14	100	94	94	99	74	73
15	100	80	80	100	71	71
16	100	82	82	100	69	69
17	100	72	72	100	54	54
Средние значения	86±10	68±12	60±13	93±4	60±8	56±8

Объем пропущенной водопроводной воды 3,8 л; диаметр фильтров 47 мм; скорость потока воды при адсорбции вирусов 1,5—3,0 мл/(мин·см²); содержание вирусов в подаваемой воде 10⁴ бляшкообразующих единиц в 1 мл; десорбция буфером глицин- NaOH, pH 11,0. Адсорбция проходила для фильтров Филтерит при pH 3,5 и для Дзета-Плюс 50S при pH 7,5. Средние значения даны с 95 %-ными доверительными интервалами.

Фильтры с положительно заряженной поверхностью применялись также для концентрирования бактериофагов (особенно колифагов, т. е. фагов, атакующих *E. coli*) из больших объемов воды и сточных вод [91]. При фильтрации 10—20 л водопроводной воды выделение составляло около 50 %. Этот метод, как

было установлено, является полезным для изучения экологии бактериофагов в естественных водах и, возможно, для оценки качества воды. Фильтры с положительно заряженной поверхностью использовались и для концентрирования вирусов гриппа из небольших объемов аллантоисной жидкости при лабораторном приготовлении вирусных концентратов [91].

12.7. КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСОВ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИОННЫХ МЕМБРАН

Для фильтрации большинства вирусов можно также использовать ультрафильтрационные мембраны с размерами пор, меньшими, чем вирус. Хотя пропускная способность таких мембран не столь велика, как у только что описанных микрофильтрационных мембран и фильтров, в ряде случаев они обладают определенными преимуществами. Берман и др. [25] описали метод концентрирования полиовирусов из воды с помощью ультрафильтрации на мембранах Миллипор РТ с номинальной отсекаемой молекулярной массой (НОММ)¹ либо 10 000, либо 100 000. С целью уменьшения забивания пор мембран, так чтобы сохранялась приемлемая скорость пропускания, были использованы кассеты Пелликон фирмы «Миллипор» (см. разд. 11.6). Наилучшие результаты по выделению вирусов получены с мембранами, имеющими НОММ 10 000, а именно достигнуто 70 %-ное выделение вирусов при 2000-кратном их концентрировании. Чтобы свести забивание к минимальному, мембраны были предварительно обработаны 3 %-ным мясным экстрактом, флокулированным кислотой.

Белфорт и др. [23] описали метод концентрирования вирусов с помощью ультрафильтрационных мембран в виде полых волокон. Эти пористые перегородки представляли собой капиллярные мембранные фильтры (модель ВМР 500515, Исследовательский институт Бергхоф GMBH, Тюбинген, ФРГ), изготовленные из полиамида, с НОММ 50 000, причем один модуль содержал 210 капилляров (каждый с внутренним диаметром 1,5 мм и толщиной стенок 0,2 мм) с общей эффективной поверхностью 0,5 м². Чтобы увеличить пропускную способность и избежать забивания пор мембран, применялся специальный контроль за динамикой прохождения жидкости через волокна. При использовании в качестве элюентов как глицинового буфера,

¹ То значение молекулярной массы при котором (а также выше которого) большинство макромолекул эффективно задерживается мембраной.—
Прим. ред.

так и мясного экстракта выделение полиовирусов составило примерно 70 %. При этом обработка 100 л водопроводной воды заняла около 90 мин.

12.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой главе мы описали применение мембран и фильтров для анализа больших объемов воды на содержание вирусов. Несмотря на то что в большинстве случаев размеры пор используемых пористых материалов много больше, чем размер вирусных частиц, последние все же могут быть извлечены из воды, в первую очередь благодаря силам электростатического взаимодействия. Как сама матрица пористых материалов, так и поверхность вирусных частиц обычно заряжены отрицательно, но заряд вирусной частицы во многих случаях может быть сделан положительным, если сделать рН воды меньше 4. После адсорбции вирусы можно десорбировать щелочным буферным раствором. В течение коротких периодов времени вирусы могут выдерживать столь сильные колебания рН, но при высоких значениях рН они довольно быстро инактивируются, так что десорбцию необходимо проводить быстро. Применяя двухстадийный процесс, можно сконцентрировать вирусы с достаточной эффективностью от начального объема 400 л до нескольких миллилитров. Для обнаружения вирусов в полученном концентрате надо провести их анализ на культуре тканей или подопытных животных. Предпринятая в последнее время разработка фильтров, поверхность которых в нейтральной области рН несет положительный заряд, делает возможным выделение вирусов без предварительного подкисления воды, что упрощает анализ.

До последнего времени в США не существовало *обязательных* вирусологических стандартов на питьевую воду, но в 1981 г. Американская ассоциация здравоохранения опубликовала *рекомендуемые* стандартные концентрации и метод анализа для кишечных вирусов [3].

Глава 13

Ультрафильтрация и обратный осмос

13.1. ВВЕДЕНИЕ

Большая часть материала в предыдущих главах касалась отделения от жидкостей частиц микроскопических размеров. В настоящей главе мы рассмотрим применение мембран для отделения частиц молекулярных размеров. Это сложный и важный вопрос, имеющий множество практических аспектов. Главное внимание в этой главе будет уделено роли мембран в процессах ультрафильтрации и обратного осмоса и использованию этих методов в биомедицинских исследованиях и в промышленных процессах.

Мы обсудим здесь три процесса: ультрафильтрацию, диализ и обратный осмос; в каждом из этих процессов миграция молекул через мембраны происходит по механизму молекулярной диффузии [114]. **Диффузия** — это процесс, при котором вещество переносится из одного места в другое под действием градиента концентраций. В случае *молекулярной диффузии* мы имеем беспорядочное движение молекул, в результате которого происходит суммарный перенос различных молекул из области высокой концентрации в область низкой концентрации.

Диализ — это процесс, при котором вещества, находящиеся в растворе, разделяются благодаря неодинаковым скоростям диффузии через мембрану, так как мембрана имеет различную проницаемость для разных веществ (полупроницаемость мембран). Диализ был одним из первых открытых мембранных процессов, нашедших широкое применение, особенно в биохимии.

Прежде чем дать определение обратному осмосу, необходимо уяснить, что такое осмос. **Осмос** представляет собой также молекулярную диффузию, но при этом происходит перенос растворителя, а не растворенного вещества. Наиболее часто используемый растворитель при осмосе — это вода. В случае осмоса вода движется из области, которая характеризуется более низкой концентрацией вещества, в область с более высокой концентрацией (рис. 13.1, а). **Обратный осмос** —

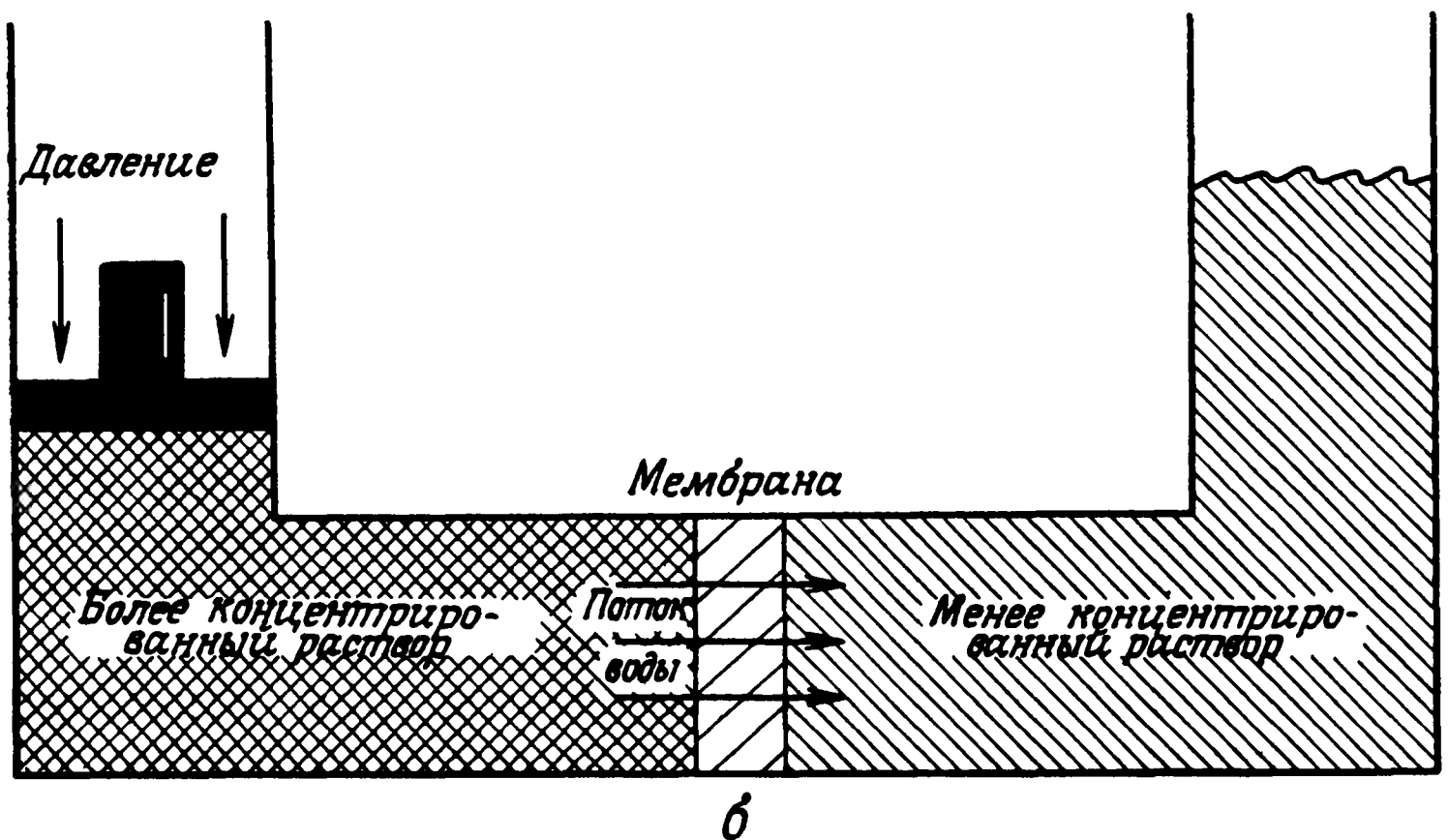
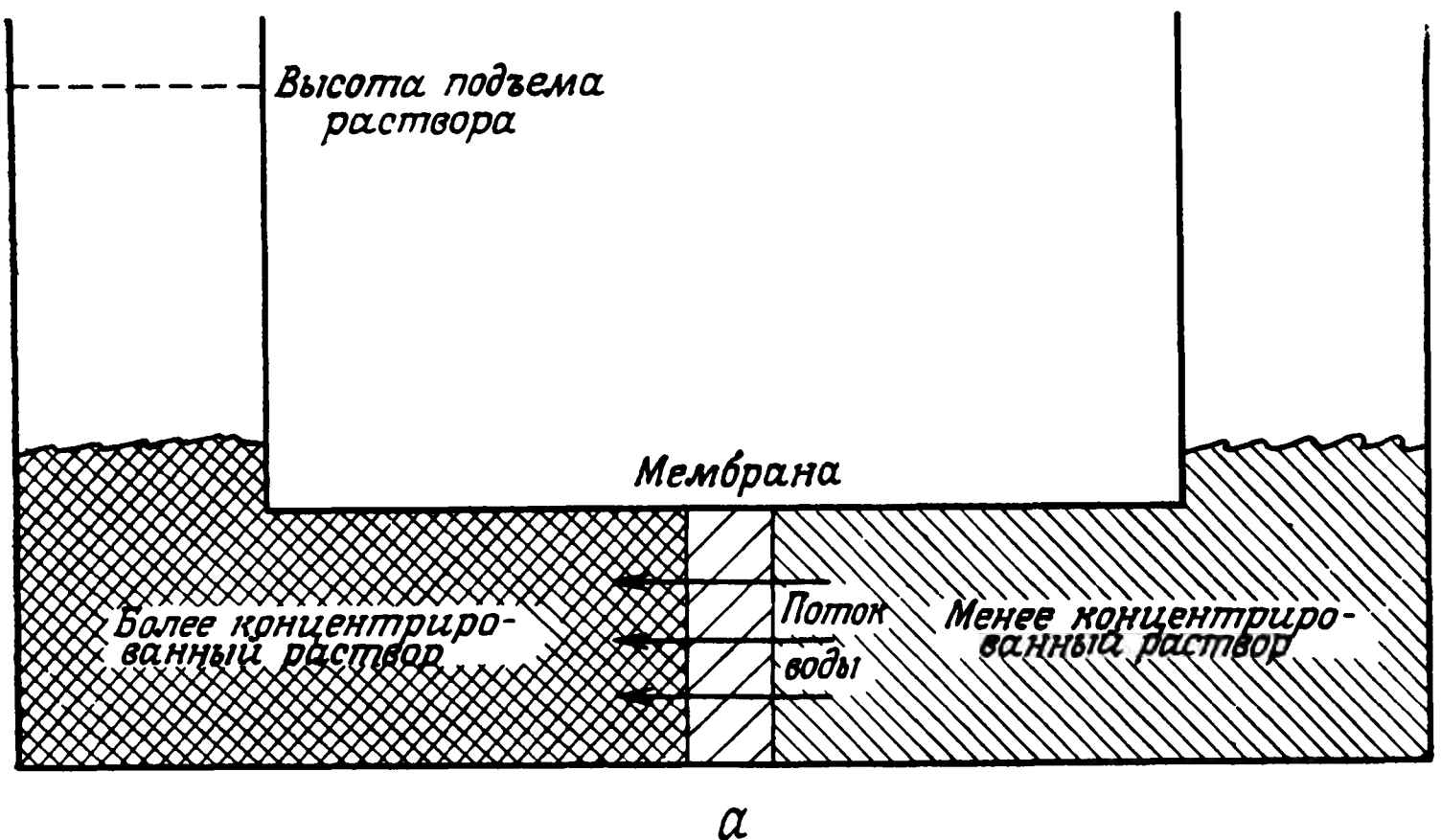
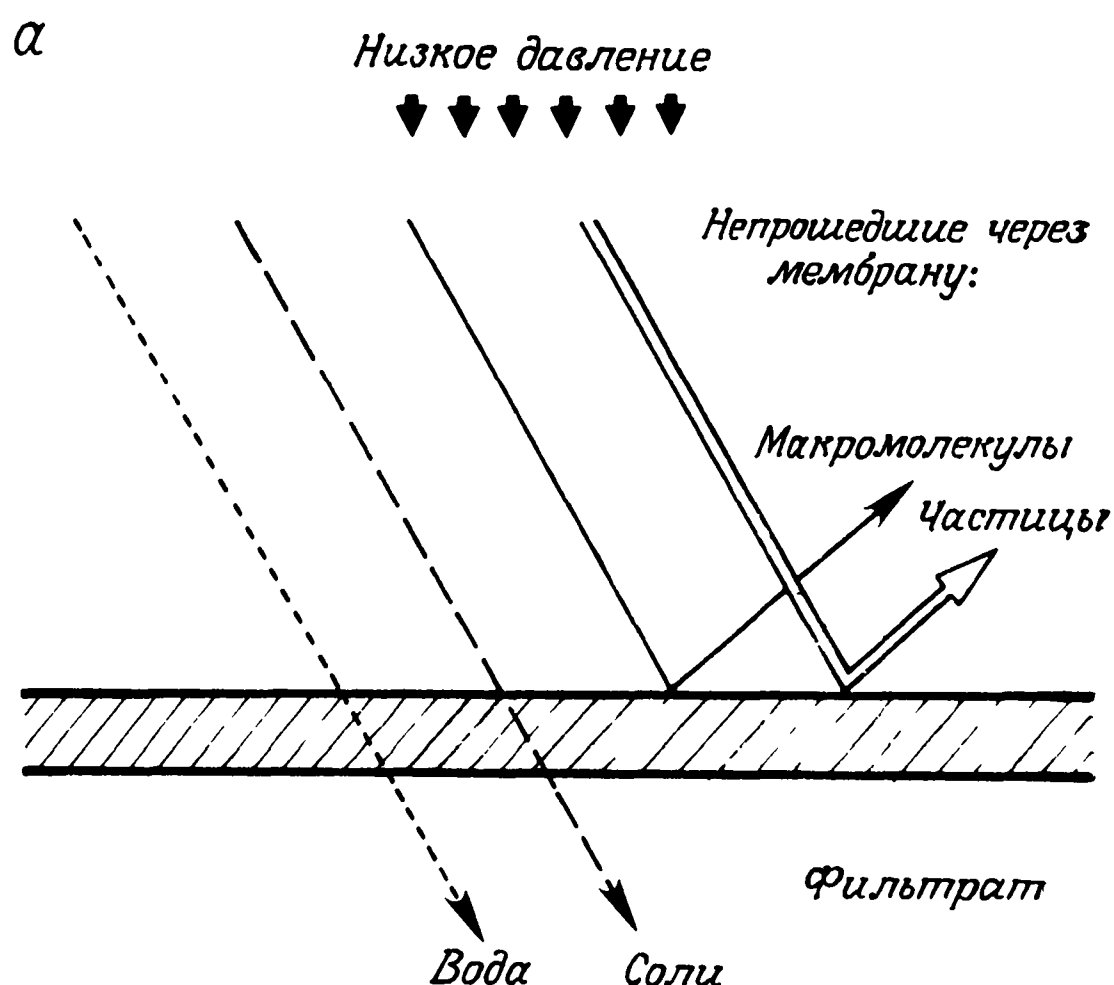


Рис. 13.1. Различие между осмосом (а) и обратным осмосом (б).

это процесс, когда растворитель (например, вода) движется в направлении, противоположном тому, в котором он двигался бы при нормальном осмосе. Обратный осмос на мембране будет происходить, только если раствор находится под давлением, превышающим осмотическое (рис. 13.1, б). Обратный осмос используется главным образом для того, чтобы *понижить* концентрацию молекул или ионов веществ, растворенных в жидкости (как правило, в воде).

Ультрафильтрация — это процесс разделения и фракционирования растворов, при котором макромолекулы отделяются от раствора и низкомолекулярных соединений фильтрацией через мембраны. Различие между ультрафильтрацией и обрат-

Рис. 13.2. Различие между ультрафильтрацией (а) и обратным осмосом (б). а — мембраны для ультрафильтрации задерживают большие молекулы, но пропускают малые; б — мембраны для обратного осмоса задерживают как малые, так и большие молекулы.



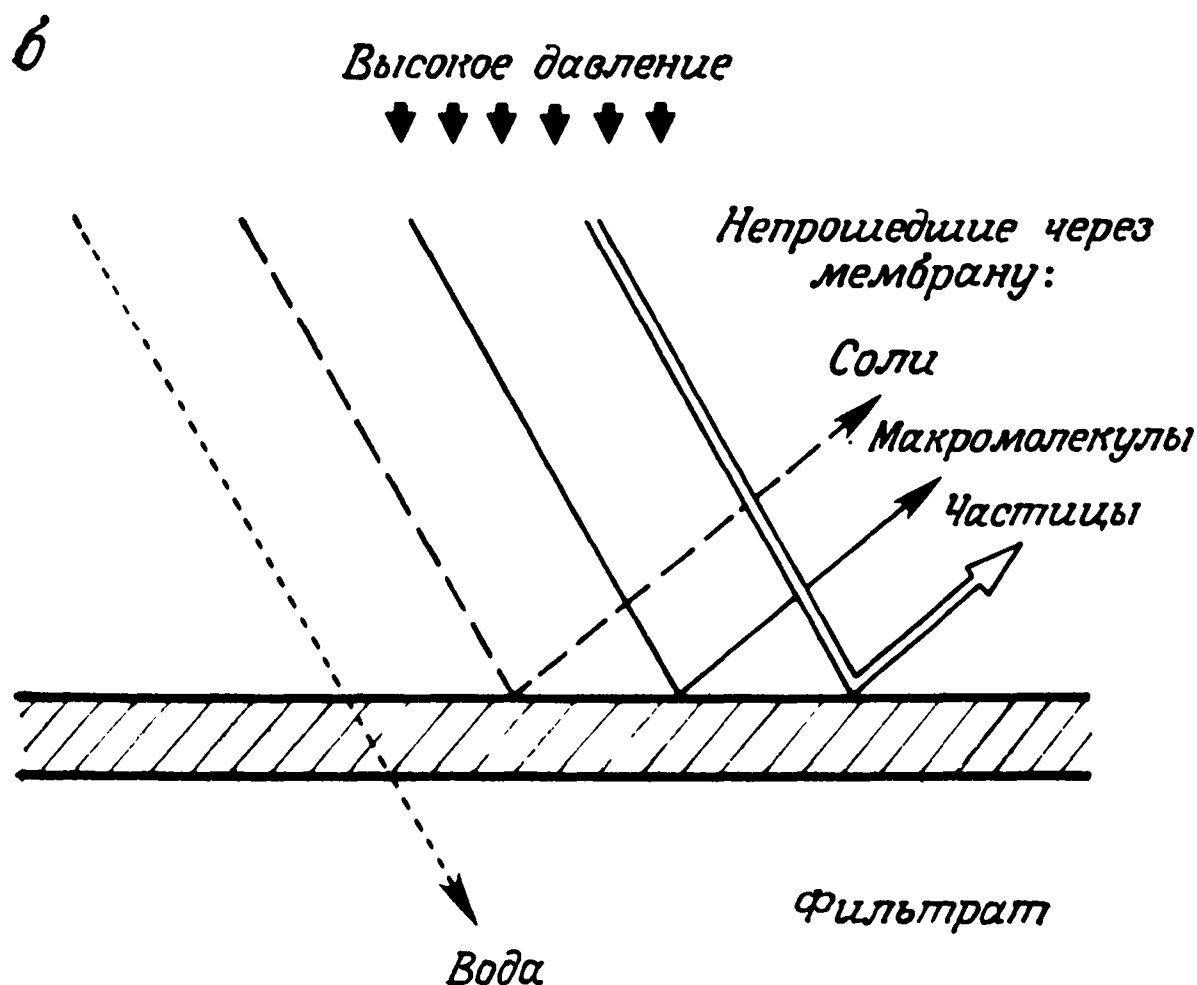
ным осмосом иллюстрируется рис. 13.2. Мы неоднократно указывали уже, что ультрафильтрация по существу не отличается от микрофильтрации, за исключением того, что при этом задерживаются не коллоидные частицы, а макромолекулы с молекулярными массами от 1000 до 1 000 000.

Ультрафильтрация и обратный осмос различаются в нескольких отношениях.

- Мембраны, используемые в обратном осмосе, имеют поры меньших размеров, чем поры мембран для ультрафильтрации, так что даже молекулы с низкой молекулярной массой не могут пройти через обратноосмотические мембраны.
- Ультрафильтрация осуществляется при относительно малом перепаде давлений, в то время как при обратном осмосе этот перепад достигает достаточно больших значений.
- При ультрафильтрации макромолекулы отделяются от низкомолекулярных веществ, например солей и воды, и в конечном результате образуется более концентрированный раствор макромолекул, в то время как при обратном осмосе вода отделяется от всех растворенных веществ и в конечном счете получают воду с пониженным содержанием растворенных веществ.
- При ультрафильтрации продукт, который нужно выделить, задерживается мембраной (концентрат), в то время как при обратном осмосе этот продукт, как правило, проходит через мембрану, а концентрат отбрасывается.

13.2. ПРОЦЕССЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО РАЗДЕЛЕНИЯ

Диффузия количественно описывается первым и вторым законами Фика и детально рассматривается в учебниках по



физической химии. Для наших целей достаточно указать следующие величины, от которых *скорость потока* молекул любого сорта находится в прямой пропорциональной зависимости.

1. *Концентрационный градиент.* Чем больше разница концентраций растворов до мембраны и после нее, тем выше скорость потока.

2. *Коэффициент диффузии молекулы.* Эта величина определяется в первую очередь размером молекулы и во вторую очередь — ее формой. Быстрее диффундируют те молекулы, у которых размеры меньше, а также те, у которых более сферическая форма.

3. *Температура.* Чем выше температура, тем быстрее движутся молекулы, и, следовательно, тем быстрее происходит диффузионный перенос¹.

4. *Толщина мембраны.* Чем толще мембрана, тем меньше скорость потока вещества через мембрану.

5. *Площадь поверхности мембраны, обращенной к жидкости.* Чем больше площадь фильтрующей поверхности мембраны, тем больше расход вещества через нее. Во многих случаях толщиной мембраны можно пренебречь, но площадь поверхности мембраны — это фактор, который во всех случаях играет существенную роль, так что количественная сторона мембранных диффузионных процессов в большинстве случаев определяется выражениями, в которые входит величина площади поверхности мембраны.

¹ На самом деле коэффициент диффузии является более сложной функцией от температуры.— *Прим. ред.*

Другим понятием, которое имеет важное значение для рассматриваемых здесь процессов, является **гидродинамический поток**. Поток — это характеристика не молекулярного процесса, а массового движения жидкости через пористую среду. Основной закон, описывающий объемный гидродинамический поток жидкости через пористую среду, — это закон Дарси, первоначально выведенный для движения воды сквозь почву. Этот закон подробно освещается в учебниках по физической химии и гидрогеологии. Для наших целей здесь достаточно указать лишь, что, согласно этому закону, скорость потока жидкости через пористую среду (такую, как, например, мембрана) ведет себя следующим образом:

- она прямо пропорциональна пористости мембраны;
- прямо пропорциональна разности давлений по обе стороны мембраны;
- обратно пропорциональна вязкости жидкости; чем более вязкая жидкость, тем медленнее поток; на вязкость воды сильно влияет температура: холодная вода более вязкая, чем теплая.

На перенос растворенного вещества через мембрану оказывает влияние такое важное явление, как **концентрационная поляризация**. Это явление увеличения концентрации растворенного вещества, задерживаемого мембраной у ее поверхности вследствие избирательного перемещения растворителя через мембрану. Например, в случае осмотического процесса растворенное вещество, не имея возможности проникнуть через мембрану, накапливается в тонком пограничном слое у ее поверхности, где его концентрация становится выше, чем в основном объеме раствора. Эта увеличившаяся концентрация приводит к снижению эффективного давления вследствие увеличения осмотического давления раствора, определяемого концентрацией именно в пограничном слое, что ведет к снижению скорости процесса и к лучшей селективности. В некоторых случаях концентрация растворенного вещества в этой тонкой пленке может стать настолько высокой, что последняя делается очень вязкой и желеобразной. Диффузия через этот слой геля идет более медленно, чем через саму мембрану, даже при увеличении разности давлений по обе стороны мембраны. Поэтому при использовании мембраны в процессе молекулярного разделения важно уметь определять, контролируется ли процесс переноса вещества диффузией через мембрану или же диффузией через гелевый слой; последнее указывает на необходимость регенерации или замены мембраны. Образование гелевого слоя, если его нельзя предотвратить, может произойти в течение нескольких минут от начала фильтрации. Коль скоро такой слой геля образовался, он становится определяющим фактором, который влияет на скорость потока больше, чем сама мембрана.

Некоторые растворенные вещества образуют гелевый слой быстрее, чем другие. Способность молекулы к гелеобразованию определяется главным образом ее коэффициентом диффузии — величиной, зависящей от формы молекулы и ее молекулярной массы. Молекулы меньшего размера диффундируют быстрее, чем молекулы большего размера, а сферические — быстрее, чем линейные, имеющие ту же молекулярную массу. На скорость гелеобразования влияет концентрация вещества, склонного к гелеобразованию. С достижением определенной концентрации молекулы таких веществ начинают быстро образовывать гелеобразный слой у поверхности мембраны, удаляясь при этом из раствора; если же концентрация достаточно низка, то предел растворимости вещества не будет достигнут и образования такого пограничного слоя не произойдет.

На практике влияние концентрационной поляризации можно снизить, если создать следующие условия для прохождения потока через мембрану:

- путем энергичного перемешивания вызвать турбулентную циркуляцию жидкости над поверхностью мембраны; влияние скорости перемешивания на перенос вещества через мембрану иллюстрируется на рис. 13.3;

- создать ламинарное течение жидкости в узких межмембранных каналах, так чтобы не возникали градиенты концентрации;

- поддерживать низкую концентрацию растворенного вещества (как правило, менее 0,5 %);

- поддерживать как можно меньший перепад давлений.

Другой проблемой является **эффект Доннана**, который возникает, когда одно из растворенных веществ (например, нуклеиновая кислота или белок) находится в ионизованном состоянии, но не способно диффундировать через поры мембраны [114]. В результате диффузии растворенных веществ происходит неравномерное распределение ионов по обе стороны мембраны. Поскольку электронейтральность должна сохраняться, на мембране возникает так называемый «потенциал Доннана», который препятствует дальнейшей диффузии любого типа ионов с зарядом, противоположным тому, которым обладают неспособные диффундировать молекулы.

С учетом этих принципов можно предпринять следующие меры для того, чтобы интенсифицировать процесс мембранной фильтрации:

- из тех мембран, которые способны задерживать молекулы необходимого сорта, выбрать для работы мембрану с наибольшим размером пор;

- использовать максимальное давление, которое еще не приводит к гелеобразованию;

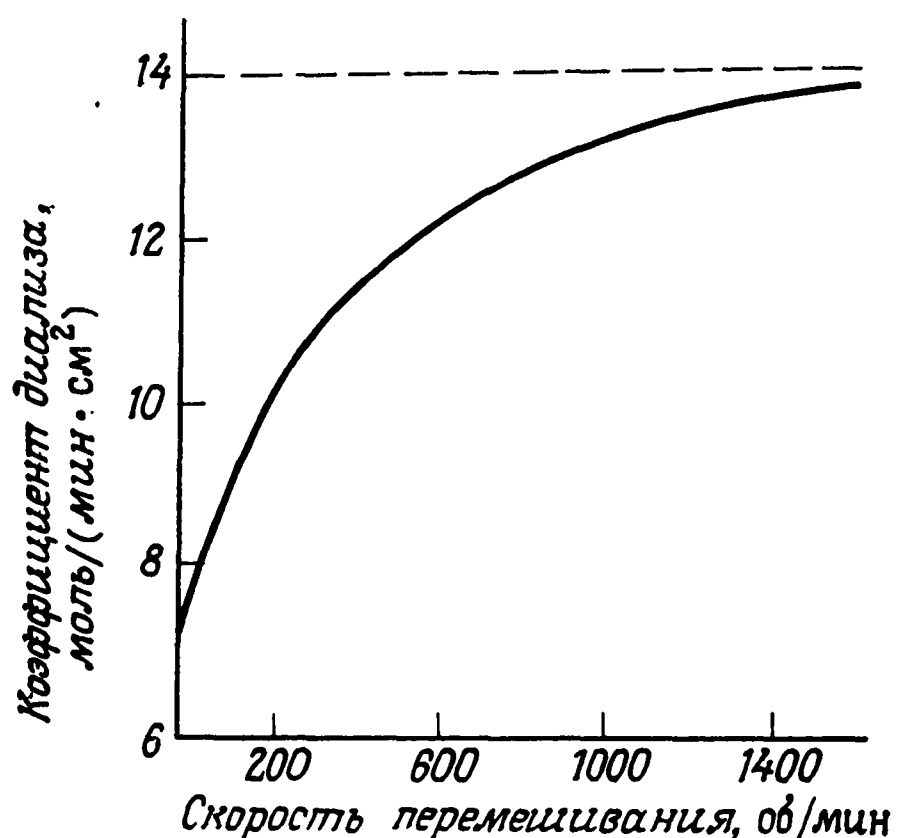


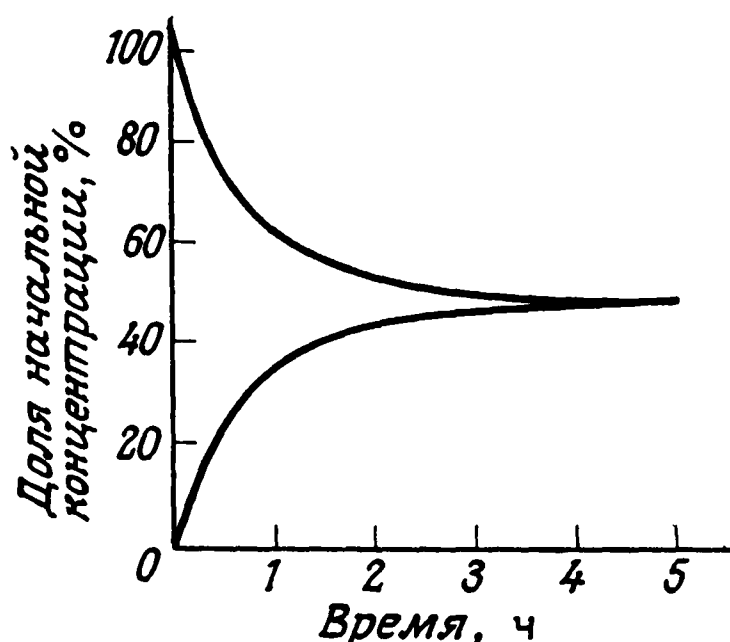
Рис. 13.3. Влияние скорости перемешивания на эффективность процесса диализа. При низких скоростях перемешивания процесс диализа подавляется концентрационной поляризацией. Максимальная скорость диализа (штриховая линия) определяется свойствами мембраны и не может быть увеличена за счет более быстрого перемешивания. (Из работы [147].)

- использовать перемешивание, чтобы жидкость вблизи от поверхности мембраны находилась в движении;
- начинать фильтрацию с самой низкой с практической точки зрения концентрации; разбавление может оказаться полезным;
- поддерживать температуру фильтруемых растворов по возможности настолько высокой, насколько указанные растворы это допускают;
- подобрать такие значения рН и ионной силы, при которых растворенное вещество, подлежащее фильтрации, имело бы максимальную растворимость.

13.3. ДИАЛИЗ

Мы определили диализ как процесс, при котором вещества в растворе разделяются благодаря диффузии через мембрану. Нашедший повсеместное применение в биохимических исследованиях диализ не отличается по существу от ультрафильтрации, но представляет собой более простой процесс, при котором единственной движущей силой является концентрационный градиент и не требуется какого-либо перепада давлений. Задача диализа, как правило, состоит в том, чтобы очистить, например, раствор белка или нуклеиновой кислоты или же клеточный экстракт, позволив ему прийти в равновесие с буферным раствором с помощью мембраны. При тех размерах пор мембраны, которые обычно используются в диализе, все низкомолекулярные вещества пройдут через мембрану, а макромолекулы задержатся. Ионы буферного раствора, находящегося по другую сторону мембраны, пройдут в противоположном направлении и уравновесят раствор макромолекул. В конеч-

Рис. 13.4. Равновесный диализ. Иллюстрируется скорость, с которой достигается выравнивание концентрации красителя (бромкрезола зеленого) по обе стороны мембраны из регенерированной целлюлозы с НОММ 12 000—14 000. (Данные заимствованы из технической документации фирмы «Фишер сайентифик компани».)



ном итоге раствор макромолекул или клеточный экстракт окажутся переведенными из той среды, в которой они были приготовлены, в новую среду (т. е. в буфер). Поскольку растворитель и растворенные вещества движутся в противоположных направлениях, не возникает затруднений, связанных с забиванием пор мембраны. Все то оборудование, которое используется для ультрафильтрации, может быть использовано и для диализа; механизмы обоих процессов мы опишем в разд. 13.4.

Равновесный диализ представляет собой частный случай диализа, который применяют в биомедицинских исследованиях для изучения связывания низкомолекулярных веществ с биологическими макромолекулами. Этот процесс состоит в отделении раствора, содержащего макромолекулы, от раствора, содержащего низкомолекулярное вещество, как правило, радиоактивно меченное. В результате диализа низкомолекулярное вещество распределяется по обеим сторонам мембраны, и, если отсутствует селективное связывание с макромолекулами, его концентрация при достижении равновесия должна быть одной и той же по обе стороны мембраны. Если макромолекулы связывают низкомолекулярное вещество селективно, то суммарная концентрация последнего (как связанного, так и свободного) будет возрастать по ту сторону мембраны, где содержатся макромолекулы. Зная молекулярные массы макромолекулы и низкомолекулярного вещества, путем соответствующих вычислений можно определить степень связывания.

Равновесный диализ широко используется для измерения сродства ферментов к субстратам и ингибиторам, для изучения связывания лекарственных препаратов с сывороточными белками и для изучения связывания антигенов с антителами. Чтобы максимально использовать возможности равновесного диализа, желательно работать с малыми объемами и мембранами сравнительно большой площади фильтрующей поверхности. На рис. 13.4 показана скорость достижения равновесия в типичном опыте по равновесному диализу. Чтобы свести

к минимуму сдвиг равновесия, обусловленный эффектом Доннана (разд. 13.2), и исключить зарядовые эффекты, вызванные присутствием в растворе макромолекул, желательно добавлять достаточное количество буферного раствора или нейтральную соль.

13.4. УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ

Как было указано выше (см. рис. 13,2,а), ультрафильтрация — это процесс мембранного разделения, при котором из раствора отфильтровываются макромолекулы. Существуют следующие три главные области применения ультрафильтрации:

1. Концентрирование, т. е. увеличение концентрации макромолекул удалением растворителя.

2. Обессоливание растворов макромолекул (удаление из раствора ионов и низкомолекулярных примесей), или изменение солевого состава диализацией, т. е. ультрафильтрацией с непрерывной подачей в исходный раствор макромолекул растворителя (этот процесс отличается от диализа, описанного выше, тем, что движущей силой ультрафильтрации является разность давлений по обе стороны мембраны).

3. Фракционирование молекул разделением их по величине. Последний процесс возможен благодаря тому, что мембраны для ультрафильтрации обычно характеризуются строго определенными значениями отсекаемой молекулярной массы.

В своей простейшей форме, а именно для концентрирования макромолекул, ультрафильтрация состоит в удалении растворителя из раствора. Для осуществления этого процесса используется мембрана, проницаемая для растворителя, но не для растворенного вещества, концентрацию которого необходимо повысить. Растворитель проходит через поры мембраны и оказывается в нижней (по потоку) части системы. Перенос растворенных молекул осуществляется путем конвекции в объеме раствора над мембраной, а также посредством молекулярной диффузии и объемного течения через мембрану. Скорость прохождения растворителя через мембрану определяет скорость ультрафильтрации в целом. Наряду с размером пор на этот процесс оказывают значительное влияние способность мембраны смачиваться (т. е. ее гидрофильность), а также толщина мембраны и извилистость ее пор.

13.5. МЕМБРАНЫ ДЛЯ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Первые мембраны, изготовленные из нитроцеллюлозы и описанные Бехгольдом в 1907 г. [22], были мембранами для ультрафильтрации, и до второй мировой войны практически все

биомедицинские исследования с использованием мембран проводились с мембранами такого типа. Ранняя литература по этому вопросу и другие аспекты этого «классического» периода подробно освещены Джекобсом [115]. В настоящее время нитроцеллюлозные мембраны этого типа с размерами пор от 0,01 мкм или больше (отсекаемая молекулярная масса более 70 000) поступают в продажу от нескольких поставщиков мембранных фильтров (фирмы «Сарториус», «Шляйхер и Шуль», «Микрофилтрейшн системс»). Большинство этих мембран являются *изотропными*, и, поскольку отверстия пор одинаково малы по обе стороны мембраны, скорости потока невысоки. С появлением новой технологии изготовления мембран для обратного осмоса (см. разд. 13.9) существенное развитие получило также производство *анизотропных мембран* со значениями отсекаемых молекулярных масс, пригодными для ультрафильтрации. Такие анизотропные мембраны обеспечивают намного большие скорости потока, и обычно они позволяют более точно управлять процессом ультрафильтрации. Анизотропные мембраны производятся фирмами «Миллипор» (мембраны типа Пелликон), «Амикон» (пленки Диафло и полые волокна Диафло), «Дорр-Оливер» (специальные плоские мембраны) и «Нуклепор» (УФ-мембраны сетчатого типа, которые не следует путать с трековыми мембранами Нуклепор¹). Ультрафильтрационные мембраны типа Спектра/Пор поставляются фирмой «Фишер сайентифик», и производятся фирмой «Нуклепор». Мембраны фирмы «Амикон» в виде полых волокон для крупномасштабного промышленного применения поставляются фирмой «Ромикон», филиалом фирм «Ром энд Хаас компани» и «Амикон». Мембраны фирмы «Ромикон» также поставляются для промышленной очистки воды фирмой «Вэйпоникс».

Хотя первоначально ультрафильтрационные мембраны изготавливались на основе целлюлозы, в настоящее время они производятся и из таких полимерных материалов, как поливинилиденфторид, полиакрилонитрил и полисульфон. Нецеллюлозные мембраны более устойчивы к нагреву и химическому воздействию, а потому находят более широкое применение в промышленности. Многие из этих синтетических мембран являются собственностью фирм и в документации поставщиков не расшифровываются.

Задерживающая способность ультрафильтрационных мембран характеризуется **номинальной отсекаемой молекулярной массой (НОММ)**. Речь идет о способности мембраны задерживать молекулы в зависимости от их размера. Термин «номи-

¹ Существуют и ультрафильтрационные трековые мембраны (ядерные фильтры, мембраны Нуклепор) с размерами пор 0,01—0,05 мкм.— *Прим. ред.*

нальный» вводится по той причине, что в реальных условиях форма и заряд молекулы влияют на скорость ее прохождения через мембрану. Величина задержки, определяемая НОММ, означает, что 90 % сферических незаряженных молекул данной молекулярной массы будут задержаны. Однако молекулы, вытянутые в длину и имеющие большую молекулярную массу, чем НОММ, могут пройти через соответствующую мембрану, в то время как заряженные молекулы с массой, меньшей НОММ, могут оказаться задержанными. В табл. 13.1 и 13.2 приведены задерживающие способности двух больших серий мембран, предназначенных для ультрафильтрации.

Таблица 13.1. Номинальные величины отсекаемых молекулярных масс (НОММ) для ультрафильтров фирмы «Нуклепор»

Процесс	НОММ	Тип мембраны		
		A	C	F
Обратный осмос	50	A 0,05		
	100	A 0,1		
Ультрафильтрация	500	A 0,5	C 0,5	
	1 000	A 1	C 1	
	5 000	A 5	C 5	F 5
	10 000	A 10	C 10	F 10
	20 000		C 20	F 20
	50 000	A 50	C 50	F 50
	100 000	A 100	C 100	F 100
	300 000			F 300
	500 000			F 500
	1 000 000			F 1000

Мембраны типов А, С и F изготовлены из трех различных полимерных материалов, предназначенных для работы с различными растворителями. Мембраны типа А пригодны для работы в диапазоне рН от 2 до 12 и выпускаются в виде полых волокон со значениями НОММ 2000, 10 000 и 50 000. Мембраны типа С предназначены для работы в диапазоне рН от 2 до 10 и более устойчивы к органическим растворителям, чем мембраны типа А. Мембраны типа С слабо адсорбируют белки и подходят для концентрирования их разбавленных растворов. Мембраны типа F работают в диапазоне рН от 1 до 14, устойчивы к хлору и большинству органических растворителей, могут подвергаться обработке в автоклаве, а также использоваться при температурах до 130 °С.

Простой способ проверки ультрафильтрационных мембран заключается в определении скорости протекания через нее воды при стандартных значениях перепада давления и вязкости. Такое простое измерение скорости протекания воды может оказаться особенно полезным для сравнения мембран, полученных от различных изготовителей, или же мембран разных партий одного и того же изготовителя.

Таблица 13.2. Номинальные величины отсекаемых молекулярных масс для ультрафильтров фирмы «Амикон»

Дисковые мембраны	НОММ	Полое волокно	НОММ
UM05	500		
UM2	1 000		
		H1P2	2 000
		H5P2	2 000
YM5	5 000	H1P5	5 000
		H10P5	5 000
PM10	10 000	H1P10	10 000
YM10	10 000	H5P10	10 000
YM10U	10 000	H10P10	10 000
UM10	10 000		
UM20	20 000		
PM30	30 000		
YM30	30 000		
XM50	50 000	H1X50	50 000
		H10X50	50 000
XM100A	100 000	H1P100	100 000
		H10X100	100 000
XM300	300 000		

Значения НОММ для ультрафильтрационных мембран типа Диафло фирмы «Амикон» относятся к мембранам как в виде дисков, так и в виде полых волокон.

13.6. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Для многочисленных лабораторных целей достаточно самого простого оборудования, но при работе с ультрафильтрами желательно иметь специальные устройства. Фирмы «Амикон» и «Нуклепор» производят широкий набор аппаратуры для работы с ультрафильтрами, а фирма «Миллипор» продает для препаративных целей систему кассет Пелликон (см. разд. 11.6). Поскольку перепад давлений, необходимый для проведения ультрафильтрации, невелик, можно пользоваться перистальтическими насосами или сжатым газом.

Ячейки с перемешиванием используют для обессоливания или концентрирования в тех случаях, когда концентрация высокомолекулярных веществ в фильтруемых растворах не слишком велика. Раствор может быть сконцентрирован более чем в 100 раз, от минимальной исходной концентрации 0,05 % до максимальной конечной концентрации 10 %. Эти устройства (рис. 13.5) представляют собой замкнутую систему, которая обеспечивает проведение ультрафильтрации под давлением и перемешивание растворов над мембраной с помощью магнитной мешалки. Эти ячейки выпускаются с различными разме-

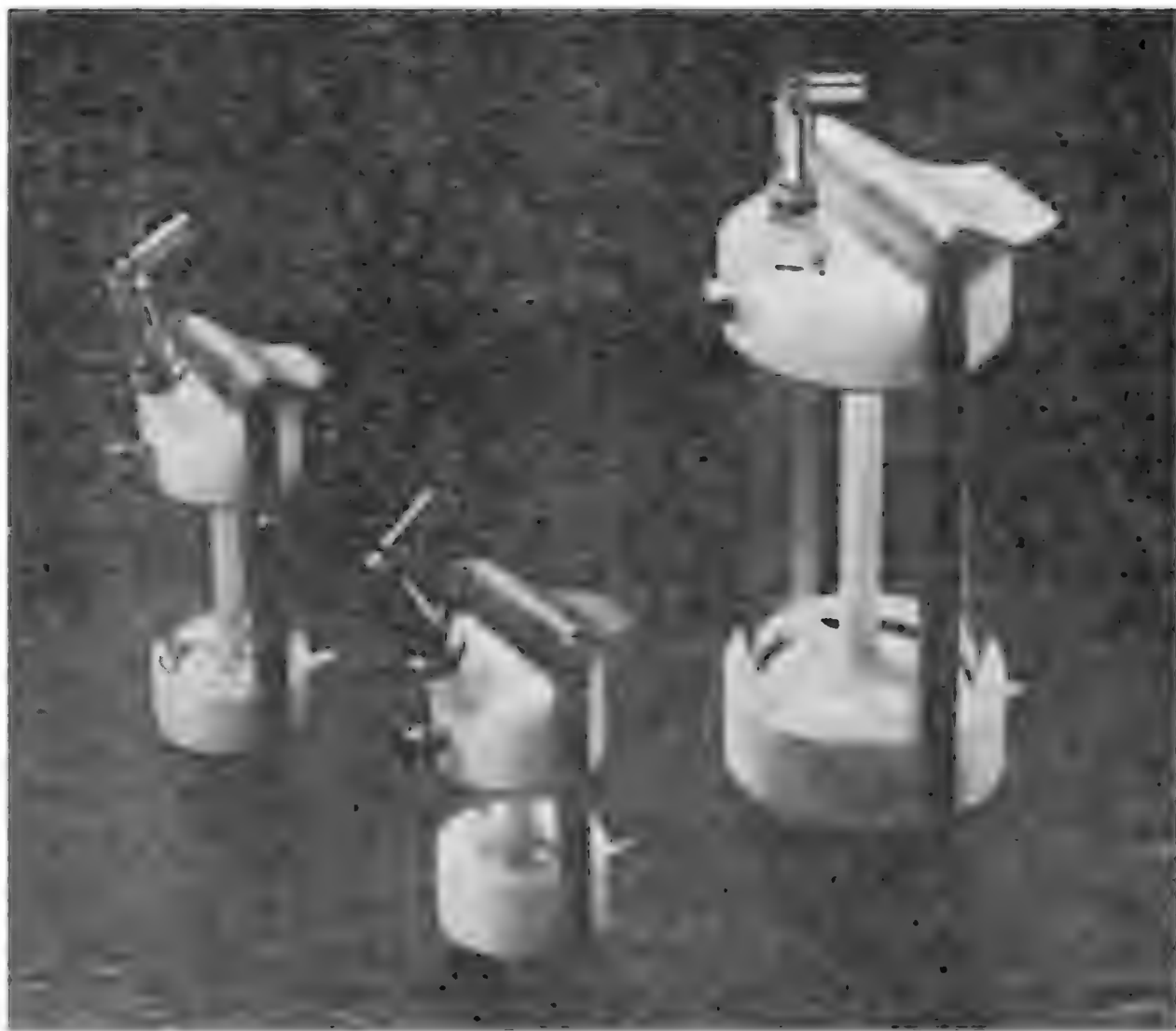


Рис. 13.5. Набор ячеек с перемешиванием для ультрафильтрации. (Фото любезно предоставлено фирмой «Нуклепор»).

рами в зависимости от используемых объемов жидкости, начиная с минимального объема 0,075 мл и кончая несколькими литрами. Указанные ячейки предназначены для работы при низких давлениях (примерно до 5 атм). Для работ при более высоких давлениях фирма «Нуклепор» поставляет ячейки с перемешиванием, выполненные из нержавеющей стали и позволяющие отфильтровывать до 400 мл раствора при давлении до 100 атм. При давлениях этого порядка мы вступаем в область обратного осмоса.

Фирмы «Амикон» и «Нуклепор» поставляют ультрафильтры из полых волокон, а также оборудование для работы с ними. Полые волокна (рис. 13.6) обеспечивают исключительно высокую площадь фильтрующей поверхности на единицу объема и эффективный поток жидкости над мембраной, что снижает эффекты концентрационной поляризации. В результате достигаются намного более высокие скорости протекания жидкости и более эффективная фильтрация. Ультрафильтрационная ячейка на полых волокнах представляет собой пучок волокон, запрессованных в пластмассовый корпус. На основе полых волокон фирма «Нуклепор» выпускает оборудование, позволяющее фильтровать объемы от нескольких миллилитров до объ-

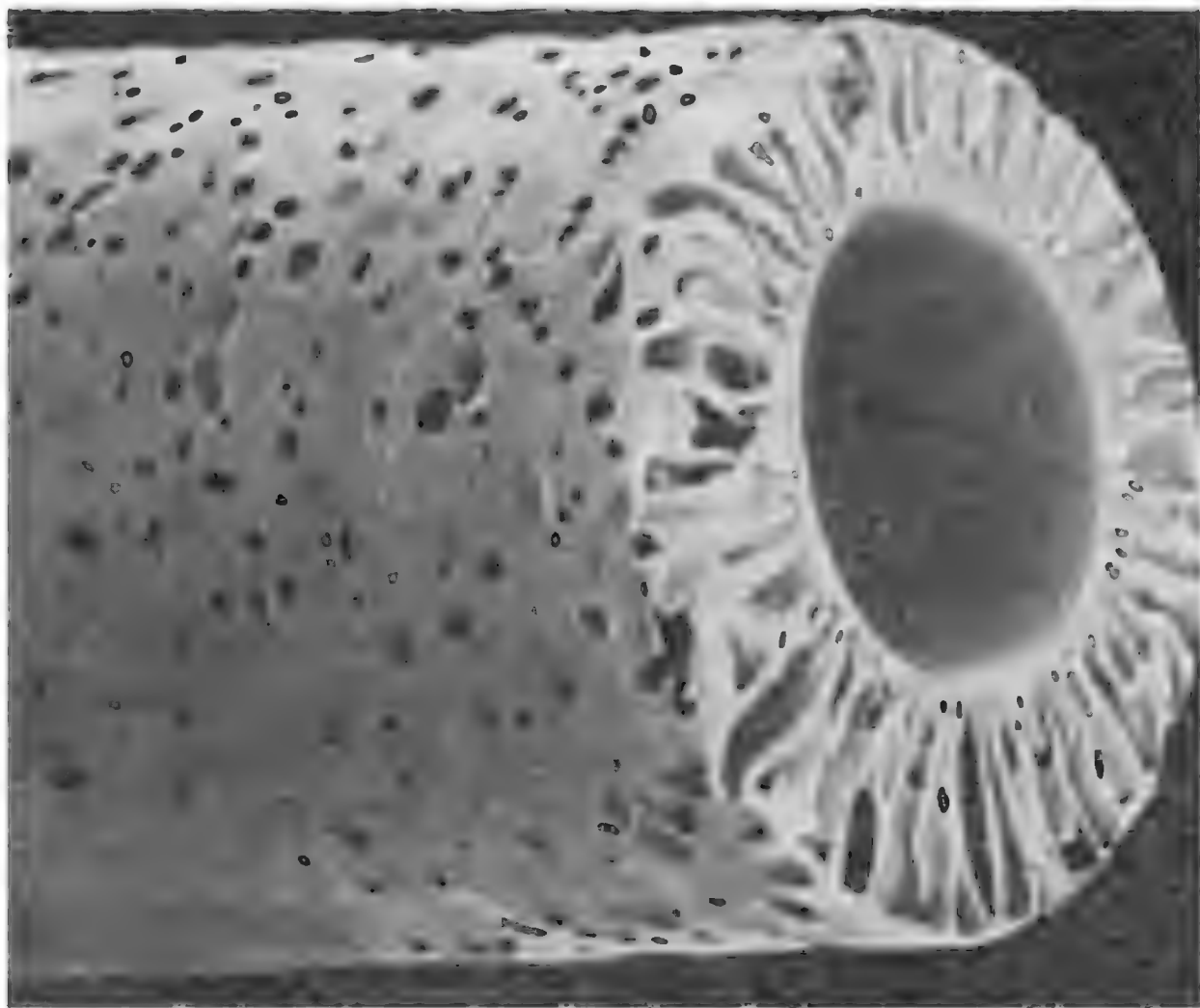


Рис. 13.6. Микрофотография полого волокна (ультрафильтра), полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Диаметр центрального отверстия около 0,2 мм. Следует отметить высокую степень анизотропии. Поток жидкости направлен обычно извне к центру волокна. Для практического использования множество таких волокон собирается в один пучок. (Фото любезно предоставлено фирмой «Амикон».)

емов, используемых в опытно-промышленных установках (более чем 10 л). Фирма «Амикон» выпускает волоконные патроны с диапазоном пропускной способности от 200 мл до более чем 100 л. Эти волоконные патроны можно использовать повторно или же непрерывно в течение длительного времени. «Амикон» предлагает также серию тонкоканальных устройств, в которых движение жидкости над мембраной таково, что позволяет сводить к минимуму накопление на поверхности мембраны задерживаемых ею веществ. В результате достигаются более высокие скорости потока через мембрану и скорости ультрафильтрации в целом по сравнению с ячейками с перемешиванием. Тонкоканальные устройства особенно хорошо подходят для фильтрации раствора с такими высокими концентрациями, как 40 %, или для фракционирования макромолекулярных смесей.

По сравнению с обычной ультрафильтрацией более эффективным для обессоливания является процесс диафильтрации (рис. 13.7). Диафильтрация протекает при постоянном рабочем объеме, поскольку удаляемый фильтрат непрерывно замещается свежим растворителем. При этом концентрация задержан-

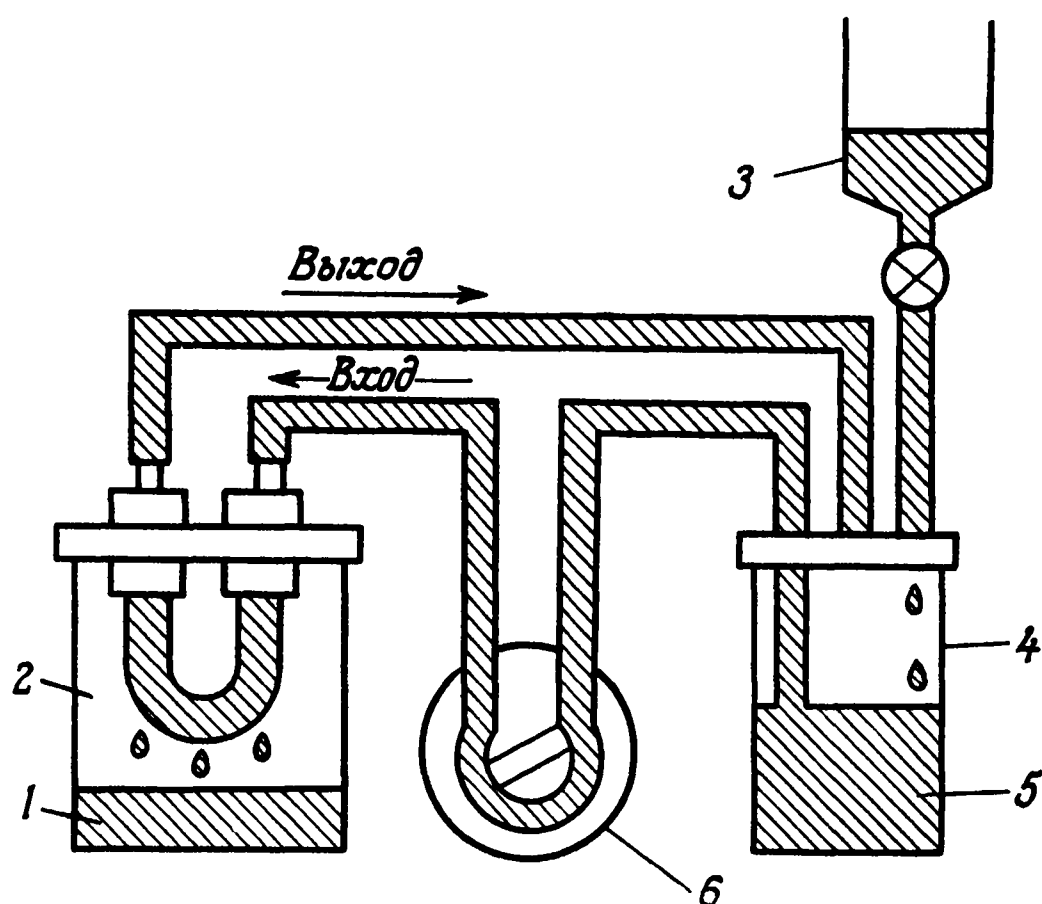


Рис. 13.7. Обессоливание с помощью диафильтрации. По мере того как соли и растворитель проходят через ультрафильтрационную мембрану, из резервуара поступает свежий растворитель, в результате чего сохраняется постоянный объем раствора. 1 — соли; 2 — ячейка с мембранами на основе полого волокна; 3 — резервуар со свежим растворителем; 4 — герметичный резервуар; 5 — раствор, подвергающийся обессоливанию; 6 — перистальтический насос.

ных мембраной веществ не возрастает, так как они непрерывно разбавляются свежим буферным раствором. Намного более высокая эффективность диафильтрации для обессоливания объясняется тем, что в данном случае движущей силой является не концентрационный градиент, а гидростатическое давление.

Предназначенная для препаративной ультрафильтрации каскадная система Пелликон, предлагаемая фирмой «Миллипор», несколько отличается от устройств, описанных выше. Сам ультрафильтр состоит из очень тонкой (20—30 нм) полупроницаемой мембраны, прочно связанной с пористой подложкой. Последняя обеспечивает механическую устойчивость и оказывает малое сопротивление потоку, а поскольку сама мембрана очень тонка, достигается высокая скорость фильтрации. Ультрафильтры Пелликон выпускаются в виде дисков, пленок, пакетов или кассет, причем последние используются в каскадной системе Пелликон. Существуют пять типов мембран со значениями НОММ от 1000 до 1 000 000. Эти мембраны можно использовать в любого рода устройствах, уже описанных выше, либо в каскадной системе Пелликон (см. разд. 11.6). Кассеты могут использоваться при давлениях до 7 атм (в режиме обычной фильтрации либо в режиме диафильтрации). Общий объем

раствора над мембранами для этой системы составляет 200 мл. Кроме того, фирмой выпускается подобная кассетная система из нержавеющей стали, рассчитанная на фильтрацию больших объемов.

Для ультрафильтрации небольших объемов (1—50 мл) фирма «Миллипор» производит так называемые погружаемые ультрафильтры Иммерсибл-СХ, которые состоят из пористой полипропиленовой сердцевины, покрытой ультрафильтрационной мембраной со значениями НОММ 10 000 или 30 000. Выходное отверстие устройства подсоединяют к вакуумному насосу, а само устройство помещают в сосуд с образцом. Вода, соли или другие низкомолекулярные вещества проходят через мембрану, а выделяемый продукт остается в сосуде сконцентрированным и обессоленным. Для снижения концентрационной поляризации это устройство можно подсоединить к специальной мешалке, которую фирма выпускает отдельно.

Фирма «Байо-Молекулар дайнэмикс» производит удобное приспособление Микропродикон для вакуумного концентрирования образцов различных объемов от больших до исключительно малых (25 мкл). В этом автономном вакуумируемом приборе диализная или ультрафильтрационная мембрана поддерживается в вертикальном положении пластмассовым стержнем, который погружен в рабочую камеру. Образец, содержащийся в открытом резервуаре, заполняет пространство между мембраной и стержнем и, по мере того как вода и соли удаляются, концентрируется и собирается в небольшом сборнике, расположенном на дне. Размерами этого сборника определяется конечный объем сконцентрированного образца. После того как прибор собран и вакуумирован, он становится полностью автономным и может быть помещен в холодную комнату или водяную баню. Из рекламы фирмы следует, что, поскольку пленка жидкости между мембраной и стержнем тонка, концентрационная поляризация сведена к минимуму. К устройству Микропродикон выпускаются мембраны Продимем со значениями НОММ 10 000 и 15 000.

13.7. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ И ДИАЛИЗА В МЕДИЦИНЕ

Развитие мембранной технологии привело к использованию ультрафильтрации и диализа в нескольких важных областях медицины. Наиболее сенсационным следует признать создание **искусственной почки** для гемодиализа. Почка живого организма осуществляет ультрафильтрацию крови с помощью клубочковых капилляров и удаляет таким образом шлаки, или конечные

продукты обмена. В сутки через почку фильтруется до 180 л жидкости, при этом образуется около 1,5 л мочи. В искусственной почке для удаления шлаков используется процесс мембранной ультрафильтрации. Мембраны на основе целлюлозы применяют либо в виде плоских пленок, либо в виде полых волокон. Ток крови через систему должен быть таким, чтобы свести к минимуму концентрационную поляризацию и одновременно избежать турбулентности, которая может вызвать вспенивание и денатурацию компонентов крови. Первоначально установки для гемодиализа использовали только в клиниках, теперь же ими можно пользоваться и в домашних условиях. В настоящее время процедура настолько хорошо отработана, что пациенты могут жить без почек достаточно долгое время.

Оксигенация крови (обогащение кислородом) широко применяется при легочной или сердечной недостаточности. Хотя оксигенация крови может быть достигнута простым барботированием, этому мешают вспенивание и другие факторы, что привело к разработке мембранных оксигенаторов. В таких оксигенаторах кровь отделена от газовой фазы мембраной, которая легко проницаема для кислорода и углекислоты. В то время как кровь протекает по одну сторону мембраны, происходит газообмен, приводящий к удалению из крови углекислого газа и обогащению ее кислородом. При этом применяют либо пленочные, либо капиллярные мембраны, материал же мембран существенно отличается от используемого в системах жидкость/жидкость, поскольку целлюлозные мембраны плохо пропускают кислород. Наилучшим материалом для этих мембран является силиконовый каучук, который не только проницаем для газа и практически непроницаем для воды, но может быть, кроме того, подвергнут обработке в автоклаве.

Мембраны используют в медицине также для **инкапсулирования лекарственных препаратов**. Помещая лекарство в капсулу из полупроницаемой мембраны, достигают контролируемого, равномерного и длительного поступления его в организм. Лекарственная имплантация применяется при гормональной терапии, чтобы компенсировать недостаточность, вызванную эндокринным заболеванием, и там, где необходимо локальное поступление лекарства. Материал мембраны должен быть нетоксичным, биологически совместимым и в то же время обладать высокой проницаемостью в отношении лекарственного препарата. Наиболее подходящим материалом для инкапсулирования лекарств является силиконовый каучук (см. также рис. 11.15).

Мембранная технология нашла также применение при изучении растворения и всасывания лекарств. Фирма «Сарториус» изготавливает имитатор процесса всасывания лекарственных

препаратов, который моделирует стенки желудка и кишечника; мембраны, используемые в устройстве, подобраны таким образом, чтобы лекарства могли диффундировать через них со скоростями, пропорциональными скоростям естественного всасывания в желудочно-кишечном тракте. По одну сторону мембраны помещают искусственный желудочный или кишечный сок, а по другую ее сторону — искусственную сыворотку крови. Используемый для такой имитации мембранный фильтр покрывают специальными веществами и измеряют (для данного вещества) скорость прохождения лекарства через такой мембранный барьер; получаемое значение скорости и есть константа скорости всасывания.

13.8. КРУПНОМАСШТАБНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ В ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Технология ультрафильтрации широко распространена в промышленности. В настоящей книге из-за ограниченности места мы можем лишь кратко отметить некоторые из применений. Следует также заметить, что во многих случаях промышленное использование обратного осмоса, о котором пойдет речь в следующих разделах, в той или иной степени относится и к процессу ультрафильтрации.

Крупномасштабное промышленное оборудование для ультрафильтрации поставляется фирмами «Дорр-Оливер» и «Ромикон». Мембранный фильтр фирмы «Дорр-Оливер» состоит из полисульфоновой ультрафильтрационной мембраны, имеющей вид ленты, скрепленной с пористой подложкой [127]. Эта лента собрана в патрон, который вставлен в корпус из нержавеющей стали. Такие фильтр-патроны можно использовать по отдельности или же в наборе (в больших установках), а поток жидкости через них может быть как непрерывным, так и рециркулирующим или протекающим порциями, как и в процессе диафильтрации.

Фирма «Ромикон» поставляет ультрафильтрационные мембраны в виде пучков полых волокон, каждый из которых находится в прозрачном полисульфоновом патроне. Каждый патрон снабжен входными и выходными патрубками, а также патрубками для выхода фильтрата и для обратной промывки. Эти фильтр-патроны могут быть использованы отдельно или же в наборе в установках разных размеров для применения в различных технологических схемах или для нужд санитарной микробиологии.

Компания «Вэйпоникс инкорпорейтед» продает мембраны на основе полых волокон производства «Ромикон/Амикон» для очистки воды. Вода высокой степени чистоты необходима

в микроэлектронике, фармацевтической промышленности, производстве оптических стекол, а также в аналитической химии.

Можно указать на некоторые другие применения ультрафильтрации в промышленности и фармакологии: очистка антибиотиков, концентрирование и диафильтрация альбумина, процесс непрерывного сбора продуктов ферментации, очистка кристаллизационных растворов и кондиционирование поверхности кристаллов, очистка сывороток диафильтрацией при получении диагностических реактивов; концентрирование и очистка ферментов, фракционирование макромолекул, концентрирование гормональных препаратов, стерилизация растворов для внутривенного введения, удаление пирогенных веществ, концентрирование вирусов, регенерация масляно-эмульсионных смесей, очистка стоков и регенерация растворов гальванических производств.

В молочной промышленности ультрафильтрация широко используется для обработки сыворотки, т. е. жидкости, которая остается после коагуляции молока при производстве сыра. Избавление от сыворотки, связанное с высокой биохимической потребностью в кислороде, создает трудности из-за низкой концентрации в сыворотке органических веществ. С помощью ультрафильтрации из сыворотки удастся извлечь такие белки, как лактоглобулин и лактальбумин [60, 114], и такой сахар, как лактозу. Многие годы сыворотку подвергали упариванию для получения сыра типа «рикотта»; использование же для этой цели ультрафильтрации дает большую (до 50 %) экономию энергии. Мембраны, применяемые для обработки сыворотки, могут изготавливаться как из ацетилцеллюлозы, так и из нецеллюлозных материалов. Первые обладают большей пропускной способностью, но чувствительны к гидролизу и легко забиваются. Значения НОММ используемых мембран колеблются от 20 000 до 100 000, причем задерживается 98—100 % белков, но пропускаются соли и сахара. В сыре, получаемом из сыворотки с помощью ультрафильтрации, содержание белка на сухой вес может достигать 30—70 %, что соответствует увеличению концентрации белка от 5 до 30—40 раз. В крупномасштабном производстве важное значение приобретает удельная производительность, которая в зависимости от типа используемой мембраны, свойств сыворотки и заданной степени концентрирования может достигнуть 40—80 л/м² в час.

13.9. ОБРАТНЫЙ ОСМОС

В разд. 13.1 мы рассмотрели, в чем состоит разница между ультрафильтрацией и обратным осмосом. Короче говоря, обратный осмос используют для удаления из растворов малых

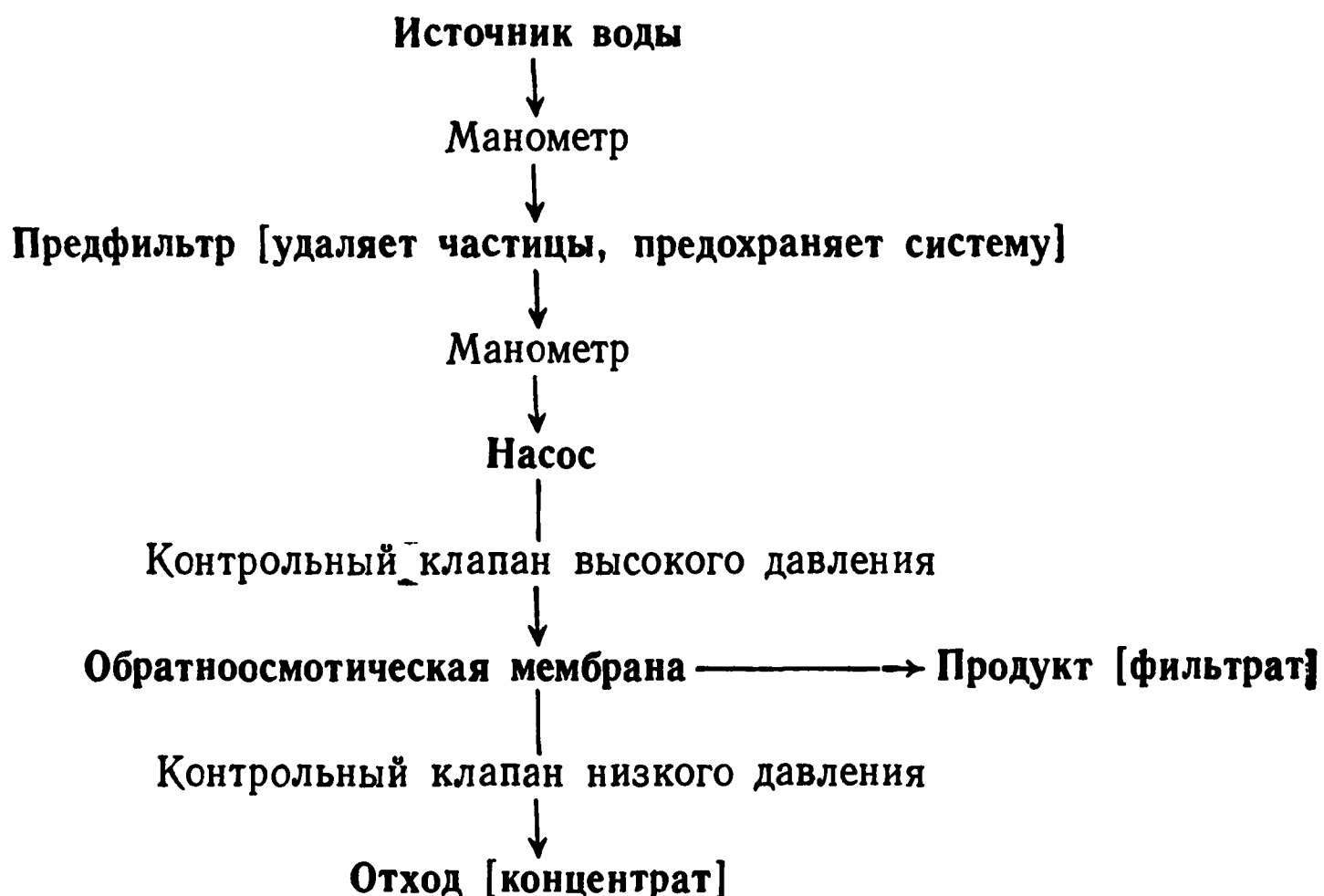


Рис. 13.8. Схема установки для обратного осмоса в одностадийном процессе. Клапаны контроля давления необходимы для успешной работы системы. Степень очистки определяется скоростью потока и перепадом давления через обратноосмотическую мембрану. При забивании обратноосмотической мембраны давление с ее рабочей стороны возрастает до чрезмерных значений, и мембранный модуль (фильтр-патрон) должен быть заменен.

молекул или ионов пропусканием этих растворов через мембрану под высоким давлением. Если ультрафильтрацию, как правило, применяют в тех случаях, когда необходимо задерживать нужное вещество, то при обратном осмосе продуктом является фильтрат. Мембраны, используемые в обратном осмосе, имеют существенно более низкие значения НОММ, чем те, которые используются в процессе ультрафильтрации, причем в первом случае применяются значительно более высокие давления. Первоначально обратный осмос был разработан для обессоливания только морской воды, но в настоящее время он широко используется также для понижения концентрации соли в умеренно или слабо соленых водах и в ряде промышленных отраслей. Так, с его помощью может быть удалено от 80 до 95 % солей из питающей воды, используемой для промышленных нужд.

Литература по обратному осмосу обширна и разнообразна. Основные принципы этого процесса подробно обсуждаются Хвангом и Каммермейером [114], а вопросы проектирования соответствующей аппаратуры и практического использования рассматриваются в книгах Сурирайана [205, 206]. Многие мембраны, применяемые при обратном осмосе, запатентованы, так

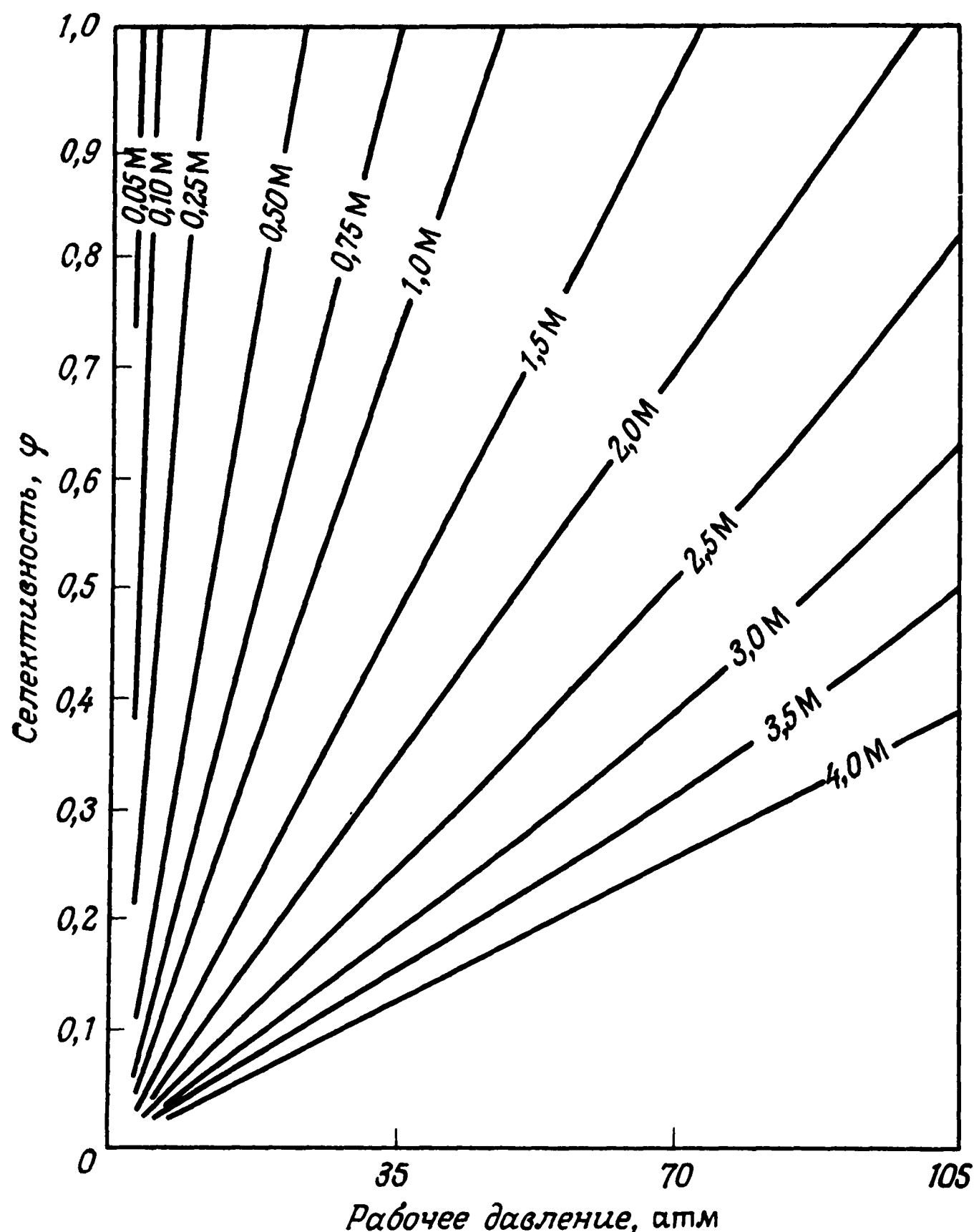


Рис. 13.9. Влияние рабочего давления в обратноосмотических установках на обессоливание воды. Селективность процесса вычислялась по формуле $\varphi = 1 - C/C_0$, где C — концентрация соли в фильтрате, а C_0 — концентрация соли в исходной воде. Цифры на кривых — концентрации соли в исходной воде. (Из книги [205].)

что некоторые важные научные подробности могут в литературе отсутствовать.

На рис. 13.8 представлено схематически устройство обратноосмотической установки. Оборудование должно быть более прочным, чем в случае ультрафильтрации, так как рабочее давление нередко достигает 100 атм. Для управления давлением необходимо иметь регуляторы противодавления и стравливающие клапаны. Роль высокого рабочего давления для функционирования обратноосмотической установки иллюстри-

руется на рис. 13.9, где показано, что обессоливание концентрированных солевых растворов требует намного более высоких давлений, чем обессоливание разбавленных растворов.

13.10. МЕМБРАНЫ ДЛЯ ОБРАТНОГО ОСМОСА

Процесс обратного осмоса приобрел практическую значимость лишь после того, как были разработаны соответствующие мембраны. История разработки мембран для обратного осмоса подробно описана Сурирайаном [205]. Правильная работа с обратноосмотическими мембранами требует учета двух факторов: проницаемости воды и задержки соли. Мембрана должна обладать необходимой прочностью для работы при высоких давлениях, химической стойкостью и устойчивостью к микробиологической атаке. Вначале большинство мембран для обратного осмоса изготавливались из ацетилцеллюлозы, причем ацетилцеллюлоза для этих мембран несколько отличается от используемой в микрофилтрационных мембранах; она содержит меньше ацетильных групп на остаток глюкозы. Теоретически на один остаток глюкозы могут приходиться три ацетильные группы, но при такой высокой степени замещения скорость прохождения воды через мембрану оказывается небольшой. С другой стороны, если содержание ацетильных групп низко, то скорость прохождения воды велика, однако селективность таких мембран (задержка ими соли) мала. По-видимому, оптимальная степень замещения должна быть в пределах 2,1—2,5, что обеспечивает задержку соли на 90—95 % и расход через единицу поверхности мембраны $(100—200) \cdot 10^{-5} \text{ г} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [114].

К другим важным характеристикам мембран относятся их стойкость по отношению к высоким и низким рН, устойчивость к хлору, к гидролизу и высушиванию, к действию бактерий и способность выдерживать динамические нагрузки под давлением [126].

Кроме ацетилцеллюлозы, для изготовления мембран был применен ряд других материалов, а именно полиамиды (найлоны), полибензимидазолы, сульфонированный диметилполифениленоксид и полиэтиленмин. Для обратного осмоса был также испытан другой класс мембран, называемых динамическими (или мембранами *in situ*). Это жидкие мембраны, которые фактически образуются непосредственно на микропористой подложке, когда на ее поверхность наносится раствор, содержащий поверхностно-активные вещества [219]. Некоторые пористые материалы, не обладающие достаточной селективностью для обратного осмоса, могут быть использованы в этих

целях, если они сформированы как динамические мембраны.

Обратноосмотические мембраны из ацетилцеллюлозы — единственные мембраны, получение которых было детально описано в литературе. Они обладают высокой степенью анизотропии, имеют достаточно крупнопористую структуру со стороны подаваемого раствора и тонкую пленку активного материала с низким значением НОММ со стороны фильтрата. Структура этих мембран аналогична, таким образом, структуре ультрафильтрационных мембран, изображенной на рис. 13.6.

Сурирайан [205] подробно описывает получение мембран путем отливки. Главное в этом процессе — включить водорастворимую добавку в отливочный раствор, а затем постепенно вымывать водой эту добавку из отлитой пленки, создавая таким образом мембрану с нужным размером пор. Условия отливки подбираются так, чтобы образовался очень тонкий активный слой, прочно связанный с микропористой рыхлой матрицей.

Рассмотрим процедуру отливки таких пленок на примере первой успешно созданной мембраны для обработки соленой воды. Отливочный раствор состоит из следующих компонентов: ацетат целлюлозы (содержание ацетильных групп 39,8 %, т. е. около 2,5 ацетильных групп на остаток сахара) 22,2 %; ацетон 66,7 %; вода 10,0 %; перхлорат магния 1,1 %. Раствор заливается тонким слоем в холодной камере на очень гладкую стеклянную пластинку при температуре от 0 до -10°C . Ацетону дают испариться в течение 3—4 мин, причем пленка частично превращается в полутвердую массу, и образуется тонкий и плотный активный слой. Отлитая пленка погружается затем в ледяную воду примерно на один час, чтобы перхлорат магния был вымыт, а сама пленка застыла. За время вымывания под поверхностью пленки формируется пористая структура, а пленка твердеет. После этого ее можно снять с поверхности стеклянной пластинки. Она, однако, еще не готова к использованию, поскольку на этой стадии не дает сколько-нибудь существенного разделения раствора. Теперь пленка подвергается гидротермальной обработке (отжигу) в горячей воде при температуре $75-82^{\circ}\text{C}$ в течение часа, в результате чего поры мембраны сжимаются, а ее селективность и механическая прочность значительно повышаются. Значение температуры отжига играет весьма важную роль; если температура слишком высока, то скорость потока становится небольшой, а если она слишком низка, то недостаточной становится эффективность задержки солей. Действительные условия, которые следует соблюдать, зависят от назначения мембраны, поскольку у мембран, предназначенных для обессоливания, селективность должна быть выше, чем у мембран, предназначенных для очистки воды. Чтобы иметь возможность готовить мембрану при ком-

натной температуре, а не на холоде [205], указанную процедуру можно модифицировать, заменив воду и перхлорат магния на формамид.

Большинство нецеллюлозных мембран для обратного осмоса выполнено в виде полых волокон с использованием соответствующих способов намотки синтетического волокна (см. разд. 3.8). Из некоторых ранних работ по полым волокнам для обратного осмоса отметим процессы изготовления, проводившиеся фирмами «Монсанто» и «Дюпон» и обсуждаемые в работе [206].

Главное преимущество полых волокон в применении к обратному осмосу заключается в том, что они обеспечивают в высшей степени выгодное отношение поверхности мембран к объему мембранного аппарата. Таким образом, используя относительно компактное оборудование, можно достичь высоких скоростей потока.

13.11. КОНСТРУКТИВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УСТАНОВОК ДЛЯ ОБРАТНОГО ОСМОСА

В обратноосмотической установке, подготовленной для конкретного практического применения, мембрана помещается внутри соответствующего аппарата. Конструкция последнего будет определяться главным образом типом применяемой мембраны, а именно тем, пленка это или полое волокно. Удобное устройство для пленочных мембран представляет собой конструкция плоскокамерного типа (рис. 13.10). Это аналог пресс-фильтра, столь часто используемого в промышленности для очистки и фильтрации. Конструкция состоит из расположенных параллельно друг над другом дренажных пластин, предназначенных для поддержки мембран и отвода фильтрата. Мембраны могут быть расположены очень близко друг к другу, если требуется ламинарный поток, или же на некотором расстоянии — для создания турбулентного потока. Конструкция плоскокамерного типа имеет те недостатки, что стоимость ее высока, она требует высокой квалификации при установке и замене мембран; вследствие трудностей, которые вызывает обращение с такими мембранами, существует большая вероятность их повреждения при сборке аппарата или возникновения течи. Кроме того, структуру потока через поверхность мембраны трудно оптимизировать. Преимущества же данной конструкции заключаются в том, что она используется в старой, хорошо отработанной технологии фильтрации и позволяет использовать легкие в изготовлении плоские мембраны.

Аппараты с фильтрующими элементами рулонного типа,

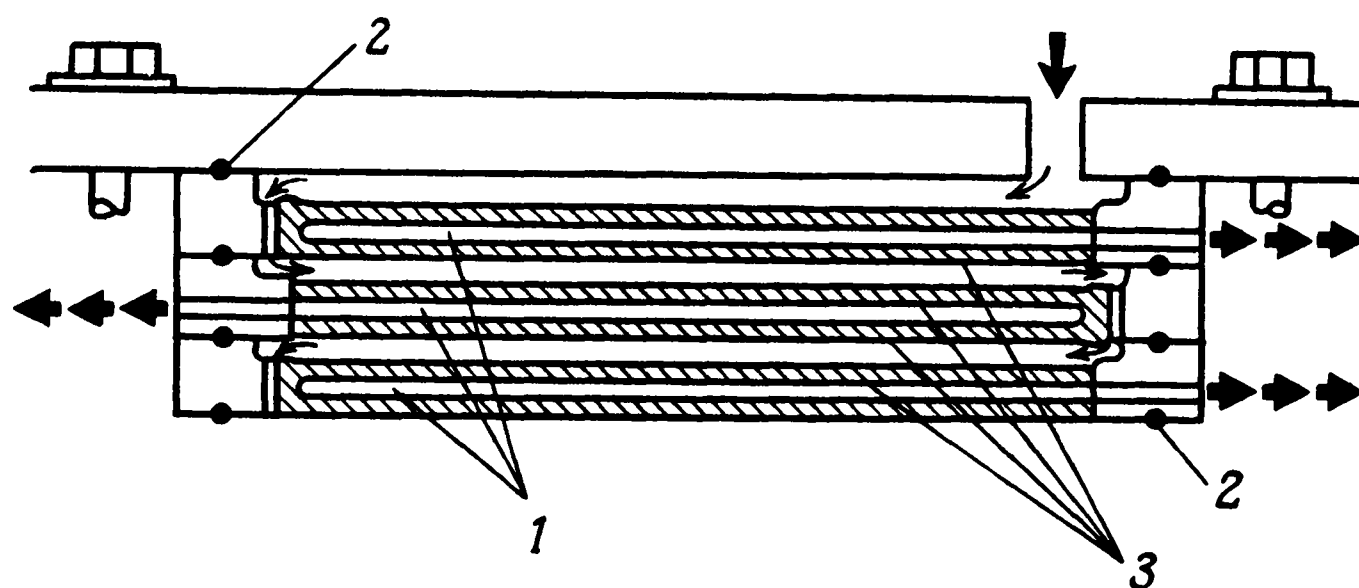


Рис. 13.10. Схема плоскокамерного мембранного модуля. Устройство собирается из ряда плоских мембран и жестких пористых дренажных пластин, скрепленных воедино кольцевыми уплотнениями. 1 — пористые пластины; 2 — кольцевые уплотнения; 3 — мембраны. (Из работы [206].)

конструкция которых показана на рис. 13.11, обладают значительными преимуществами перед аппаратами плоскокамерного типа, так как при этом компактность фильтрационной аппаратуры максимальна. Как видно из рис. 13.11, а, фильтрующий элемент рулонного типа состоит из перфорированного центрального стержня, к которому прикреплена мембрана. Слои мембран, разделенные пластиковыми ячеистыми прокладками, наматываются вокруг стержня, и все устройство затем помещается в герметичный корпус. Жидкость протекает первоначально через каналы, образованные прилегающими друг к другу мембранными листами и прокладками. Когда жидкость проходит через мембрану, она направляется по спиральному пути, пока не достигнет центрального стержня, через щелевидные пазы которого покидает систему. Аппараты с элементами рулонного типа для водоочистки продаются рядом фирм, например фирмами «Континентал уотер системс» (отделение фирмы «Миллипор»), «Аква мидье», «Вайпоникс» и «Осмоникс».

Модули из полых волокон собираются так, как показано на рис. 13.12. Поток жидкости, подаваемой под высоким давлением, проходит над наружной стороной волокон и просачивается через их стенки внутрь. В простейшей конструкции мы имеем единственный пучок волокон, который согнут в виде петли таким образом, что оба его конца закреплены в нижнем конце модуля. Возможны более сложные конструкции, в которых волокна проходят вдоль всей длины патрона и закрепляются на обоих концах.

Одна из привлекательных особенностей аппаратов с фильтрующими элементами рулонного типа и с модулями на основе полых волокон состоит в том, что они способны соединяться

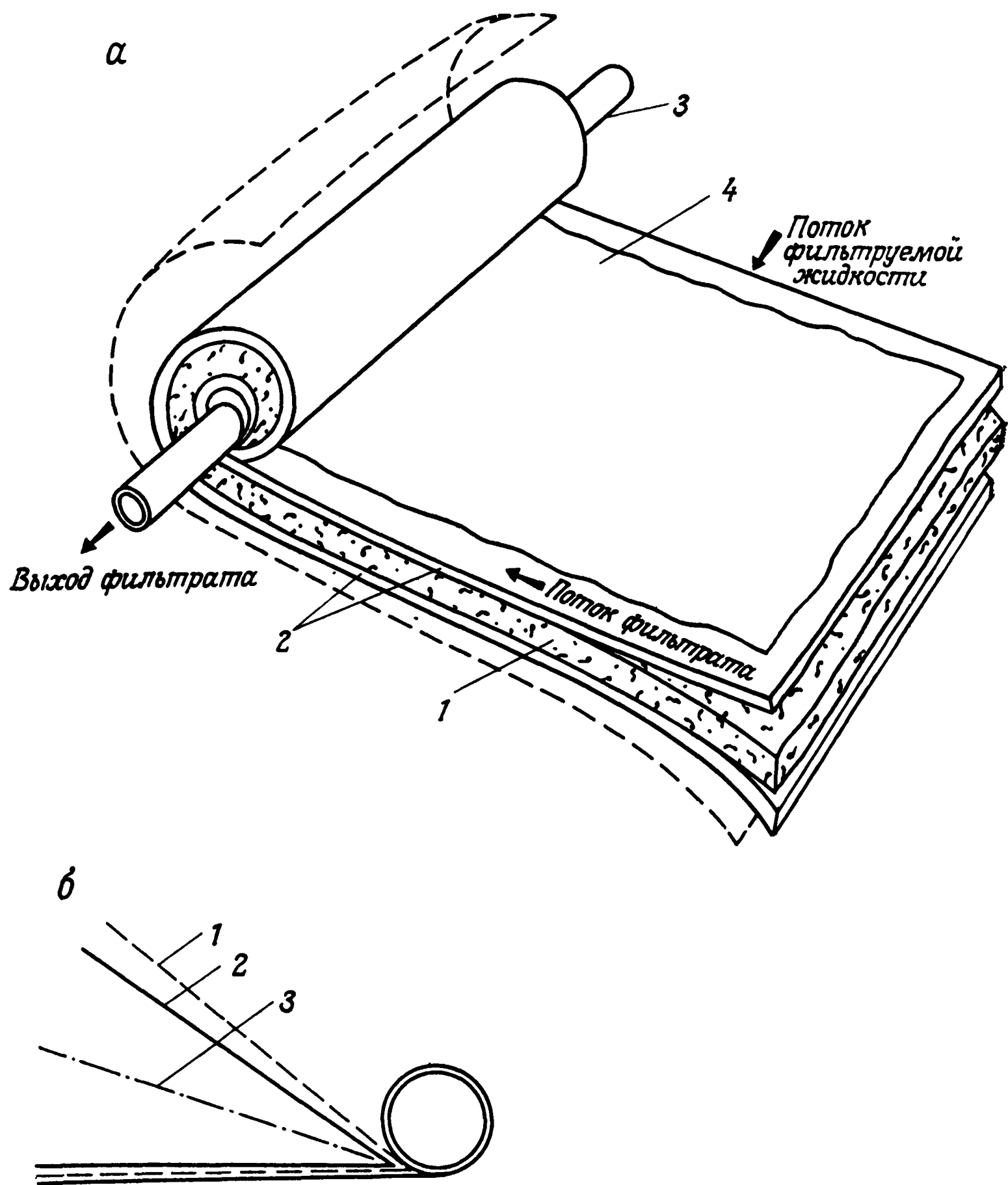


Рис. 13.11. Устройство мембранного модуля рулонного типа. *а* — в развернутом виде; 1 — разделительная сетчатая прокладка-турбуляризатор; 2 — мембраны; 3 — центральный стержень с отверстиями; 4 — дренажная прокладка; *б* — вид с торца; 1 — дренажная прокладка; 2 — мембрана; 3 — разделительная сетчатая прокладка-турбуляризатор. Турбуляризатор прокладывается между двумя мембранами, поверхности которых ориентированы таким образом, чтобы их рабочая сторона была обращена к сетке турбуляризатора. Подаваемый поток жидкости поступает в модуль вдоль турбуляризатора, проходит через мембрану, а затем по пазам дренажных прокладок и отверстиям в центральной трубке выходит наружу. (Из работы [206].)

друг с другом последовательно или параллельно и образовывать составные мембранные установки. Таким образом можно конструировать установки для обратного осмоса любой произ-

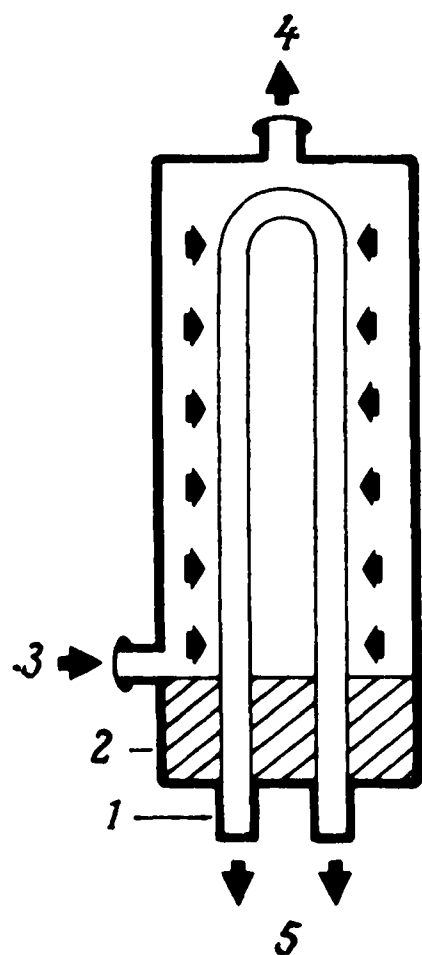


Рис. 13.12. Устройство мембранного модуля на полых волокнах для обессоливания воды. На практике в один пучок соединяется большое число полых волокон (см. рис. 13.6, где показана микрофотография отдельного полого волокна). 1 — полое волокно; 2 — уплотняющий материал; 3 — подаваемый раствор соли; 4 — сброс солевого концентрата; 5 — обессоленная вода.

водительности. На этой основе были созданы и успешно работают несколько очень крупных установок для получения питьевой воды в городах.

13.12. ЗАГРЯЗНЕНИЕ И БИОДЕГРАДАЦИЯ МЕМБРАН

Одна из главных проблем, которая должна быть рассмотрена в связи с любой крупномасштабной установкой для обратного осмоса, заключается в загрязнении мембран. Проблема загрязнения особенно актуальна, когда обрабатывается вода низкого качества. Поэтому во всех обратноосмотических установках предусмотрена предварительная фильтрация подаваемой воды для удаления основной массы крупных частиц и различных загрязняющих материалов. На загрязнение указывают снижение выхода очищенной воды или возросшее пропускание солей, что приводит к ухудшению качества конечного продукта. Наиболее часто загрязнение вызывается накоплением на мембране коллоидной массы, главным образом глинистых отложений и гуминовых кислот. Окислы металлов, в особенности железа, также могут вызвать загрязнение, и в серьезных случаях для удаления железа поступающую воду следует предварительно подвергать аэрации или фильтрации через песок. Другой тип загрязнения, называемый накипью, вызван накоплением плохо растворимых солей, таких, как карбонат и сульфат кальция или различные силикаты. Иногда при этом приходится прибегать к понижению рН подаваемой воды или к добавлению таких удаляющих накипь агентов, как полифосфат.

Другим аспектом мембранного загрязнения является микробиологическая деградация мембран. Целлюлозные мембраны медленно атакуются микробами, хотя более высокозамещенные целлюлозы менее чувствительны к атаке, чем низкозамещенные. Полиамидные мембраны не подвергаются бактериальной деградации, но на мембране может происходить рост бактерий, вызывающий ее забивание. Чтобы по возможности предотвратить это, следует избегать образования в установке зон, в которых может застаиваться вода, и добавлять в установку формальдегид при длительных перерывах в работе. При большом загрязнении воды микробами может возникнуть необходимость ее хлорирования, однако из-за чувствительности полиамидных мембран к свободному хлору он должен быть удален химически или с помощью активированного угля, прежде чем вода будет подана в обратноосмотическую установку.

Вследствие больших издержек производства при эксплуатации очень больших установок для обратного осмоса проблемы очистки являются весьма актуальными. Перечислим несколько следующих методов очистки.

- *Обратное сжатие*, при котором в системе периодически на несколько минут сбрасывается давление и аппарат промывается сильным потоком воды. Изменение давления вызывает изменение размеров подводящих путей, самой мембраны и пористых подложек. При этом загрязнения отслаиваются и механически взмучиваются, а затем смываются.
- Пропускание через систему эластичных шариков из губки, чтобы счистить примеси с мембраны.
- Химическая очистка, например понижение pH до 4, чтобы удалить нерастворимые или слаборастворимые соли. Для удаления окислов или карбонатов железа через систему может быть пропущен 2 %-ный раствор лимонной кислоты. Для удаления масел и органических загрязнений можно использовать растворы детергентов.
- Ферментная очистка. Этот метод можно применять для ликвидации белковых загрязнений, которые могут возникать, например, при производстве молочных продуктов. Можно использовать выпускаемые промышленностью ферментные препараты, содержащие протеазы и другие гидролитические ферменты.

13.13. ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОБРАТНОГО ОСМОСА

Существует много различных применений обратного осмоса в промышленности.

Обессоливание. Именно этот процесс стимулировал развитие техники обратного осмоса. Пока еще не доказана практическая

ценность этого метода для опреснения морской воды, которую в настоящее время предпочитают обессоливать дистилляцией. Однако умеренно и слабосоленые воды, характерные для засушливых областей, сейчас обессоливаются главным образом с помощью обратного осмоса.

Получение воды для лабораторных целей. Одно из преимуществ обратного осмоса заключается в том, что компактная установка может быть помещена в лаборатории рядом с раковиной и давать очищенную воду по мере необходимости (около одного литра в час). Наиболее активно в этой области работают две фирмы: «Континентал уотер системс» (отделение фирмы «Миллипор») и «Осмоникс».

Обработка промышленных отходов. Регулирование загрязнений на кожевенных заводах, гальванических и текстильных производствах.

Пищевая промышленность. Регулирование загрязнений или возврат таких полезных продуктов, как сыворотка (см. разд. 13.8). Производство кленового сиропа.

Очистка сточных вод. Обратный осмос может быть использован как третья стадия обработки бытовых стоков, чтобы удалить аммоний, органические примеси или соли. Позволяет повторно использовать отработанные воды для бытовых нужд.

Городское водоснабжение. Обратный осмос позволяет удалять токсичные примеси из источников бытового водоснабжения и сделать воду пригодной для потребления.

Химическая промышленность. Здесь применение обратного осмоса состоит в извлечении соединений, находящихся в разбавленном виде, из больших количеств жидкости. При этом, как правило, конечной целью является извлекаемый продукт, а не фильтрат.

Обратный осмос нередко используют вместо дистилляции для получения высококачественной воды. Одно из главных преимуществ обратного осмоса заключается в значительной экономии энергии, поскольку дистилляция требует большого расхода тепла. Энергетические затраты в случае обратного осмоса составляют лишь 25 % тех, что идут на дистилляцию. Однако стоимость энергии составляет лишь часть общих затрат на проведение процесса обратного осмоса. Необходимо учесть также стоимость мембранных модулей, предварительных и последующих фильтров, а также финансовые затраты на обслуживание, куда входит контроль установки, необходимый для ее нормальной работы. Такой контроль должен был бы быть непрерывным в фармацевтической промышленности, особенно при получении воды, используемой для приготовления инъекционных растворов (см. разд. 7.6), где требуется исключительно чистая вода, поскольку малейшее повреждение мембраны, не обнару-

женное немедленно, может привести к попаданию в воду пирогенных примесей.

В настоящее время обратный осмос вышел за рамки только экспериментального процесса. Он нашел широкое практическое применение, и его успешное промышленное развитие можно считать воодушевляющим. Компании, участвующие в разработке метода обратного осмоса, вообще говоря, не относятся к тем фирмам, которые производят обычные мембранные фильтры. Это скорее крупные химические и энергетические компании, которые имеют богатый опыт в различных областях полимерной химии и в состоянии производить ультрафильтрационные и обратноосмотические мембраны в промышленных масштабах. Такие фирмы, как «Миллипор» и «Нуклепор», также включились в разработки мембранных аппаратов для обратного осмоса; они изготавливают оборудование и мембраны главным образом для применения в лабораторной практике. Фирма «Осмоникс» была создана первоначально для разработок в области обратноосмотических процессов и в настоящее время производит то оборудование для лабораторных и промышленных целей, которое не изготавливается другими фирмами, ориентированными либо на лабораторные, либо на промышленные нужды. К остальным фирмам, работающим в этой области, относятся «Аква мидье», «Вэйпоникс» и «Ромикон». Некоторые из них не производят мембран, а просто монтируют оборудование для потребителей.

13.14. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей главе мы обсудили процессы разделения, включая использование мембран с малыми размерами пор, позволяющими разделять вещества на молекулярном и макромолекулярном уровнях. Мы определили ультрафильтрацию как процесс разделения, при котором большие молекулы отделяются от раствора фильтрацией через мембраны. Ультрафильтрация по существу неотличима от обычной микрофильтрации, если не считать того, что здесь мы имеем дело не с частицами, а главным образом с макромолекулами. Мембраны для ультрафильтрации производятся со строго определенными значениями отсекаемых молекулярных масс в пределах от 1000 до 1 000 000. Ультрафильтрация широко применяется в лабораторной практике (для разделения белков и вирусов), а также во все возрастающем объеме в промышленности (в технологических процессах, для возврата полезных продуктов, для очистки отходов).

Обратный осмос представляет собой перемещение воды в направлении, обратном тому, в котором она перемещалась

бы при нормальном осмосе. Обратный осмос будет происходить лишь в том случае, когда гидростатическое давление, приложенное к системе, будет достаточно большим, чтобы преодолеть осмотическое давление, возникающее при поступлении воды через мембрану. Обратный осмос — это процесс, первоначально использовавшийся для удаления из воды растворенных веществ, т. е. с целью *водоочистки*. При обратном осмосе применяют мембраны с меньшими размерами пор, чем при ультрафильтрации. В то время как ультрафильтрация осуществляется при невысоких перепадах давления, обратный осмос требует высокого давления.

Хотя первые мембраны как для ультрафильтрации, так и для обратного осмоса были целлюлозными, в настоящее время широкое распространение получили также мембраны из синтетических пластмасс. Применение мембран с высокой степенью анизотропии позволяет достигать высоких скоростей потока. В этих мембранах тонкая пленка мембранного материала с требуемым размером пор скреплена с толстым пористым мембранным слоем, что обеспечивает высокую пропускную способность. Как ультрафильтрационные, так и обратноосмотические мембраны могут быть выполнены либо в виде плоских листов для установок плоскокамерного типа, либо в виде фильтрующих элементов рулонного типа, в которых плоская мембрана тщательно обмотана вокруг центрального стержня, либо в виде фильтр-патронов с полыми волокнами, в которых пучки этих волокон заправлены в цилиндрический кожух.

Обратный осмос был первоначально разработан для обессоливания морской воды, но теперь он имеет более общее применение как часть основного процесса очистки солоноватых или пресных вод для промышленных и лабораторных целей. Обратный осмос применяется также для очистки отходов и во многих промышленных процессах, где желательно повторное использование материалов.

В дальнейшем можно ожидать, что ультрафильтрация найдет применение в такой важной области, как ферментация, для выделения и очистки белков и других продуктов, получаемых с помощью новых биотехнологических процессов (генная инженерия). Лимитирующей стадией в практическом развитии генной инженерии будет, возможно, не сам процесс манипулирования генами, а крупномасштабное и рентабельное производство биологически активных веществ на основе достижений генной инженерии. При этом ультрафильтрация и (в меньшей степени) обратный осмос найдут широкое применение в биотехнологии, что, возможно, послужит стимулом для разработки новых типов мембран и новых процессов, основанных на мембранных методах.

Глава 14¹

Фильтрация воздуха

14.1. ВВЕДЕНИЕ

Хотя мембранные фильтры первоначально были разработаны для фильтрации воды, их вскоре стали использовать также для фильтрации воздуха. Вначале это было сделано для анализа загрязнения воздушной среды, но интенсивное развитие отраслей промышленности с высокой технологией привело к необходимости осуществлять особо тщательный контроль за производственной атмосферой, поэтому фильтры и мембраны стали широко применять для очистки промышленного воздуха. Наиболее часто фильтрация воздуха через мембраны применяется для контроля безопасности служащих (личный контроль) с помощью портативных фильтрующих устройств, имеющихся у каждого сотрудника. Личный контроль дает возможность оценить риск воздушного загрязнения, с которым встречаются служащие в отдельных отраслях промышленности, и является существенной составной частью любой системы, предназначенной для обнаружения угрозы здоровью рабочего. Личный контроль широко используется в тех отраслях промышленности, где имеют дело с асбестом, хлопком, углем, цементом, песком и гравием. Другое обычное применение фильтрации воздуха — для его стерилизации в лабораторных или в промышленных целях. Если, например, какие-либо стерильные емкости должны быть заполнены воздухом, воздух предварительно должен быть простерилизован, и при этом фильтрация оказывается наиболее практичным методом.

При рассмотрении использования фильтрации для контроля загрязнения воздуха необходимо иметь в виду, что наибольшее внимание должно быть уделено тем частицам, которые могут легко попасть в дыхательные пути. Наш организм обладает

¹ Процессы фильтрации воздуха и вопросы защиты органов дыхания с применением фильтрующих материалов подробно освещены в книге: *Петрянов И. В., Кошечев В. С., Басманов П. И. и др. Лепесток (Легкие респираторы).*— М.: Наука, 1984, 216 с.— *Прим. ред.*

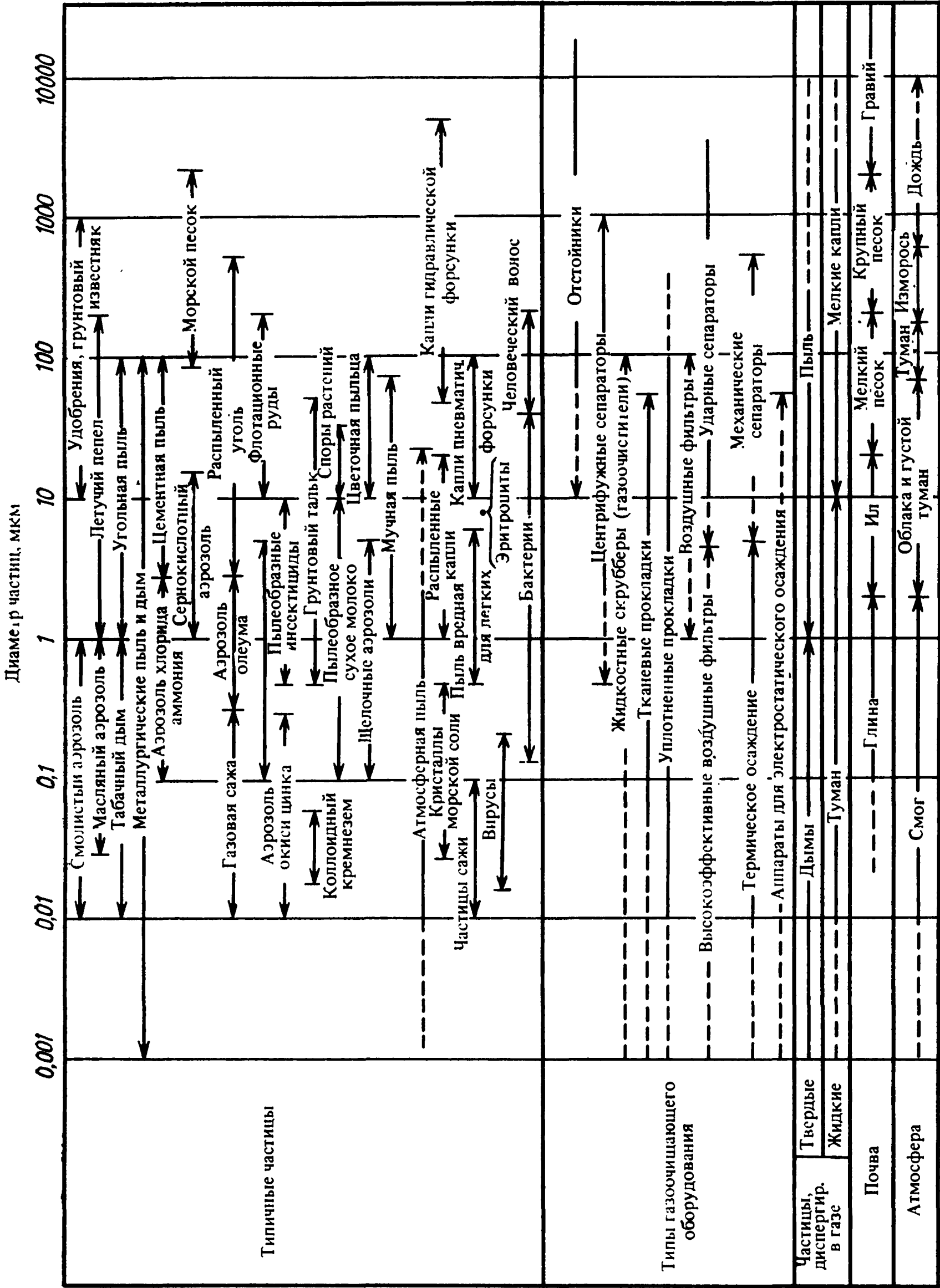
достаточно надежной фильтрующей системой, чтобы самому справиться с крупными частицами во вдыхаемом воздухе, но очень мелкие частицы ему зачастую не удастся задержать, и они могут быть затянуты глубоко в легкие, что представляет опасность для здоровья. Многие системы фильтрации воздуха предназначены для того, чтобы оценить распределение частиц по размерам, и для этой цели часто служат мембранные фильтры с калиброванными размерами пор. Мембраны фирмы «Нуклеопор», которые характеризуются строгой геометрией пор и превосходными ситовыми свойствами, находят наиболее широкое применение для анализа размеров частиц.

Взятие проб воздуха и их анализ представляют весьма обширную и технически высоко развитую область [2], поэтому в настоящей главе мы можем дать о ней лишь общее представление. Мы рассмотрим здесь главным образом механизмы извлечения мембранами частиц из воздуха и устройства для отбора проб воздуха, которые могут использоваться для аналитических целей, а также обсудим кратко методы контроля воздуха в промышленности. Хотя для фильтрации воздуха мембраны используются во многих случаях, для этой цели годятся и фильтры из таких материалов, как стекловолокно, бумага и синтетические волокна. Поэтому при необходимости мы будем рассматривать также некоторые из этих материалов.

14.2. ЧАСТИЦЫ В ВОЗДУХЕ

Анализ частиц представляет собой детально разработанную область науки. В воздухе можно обнаружить великое множество частиц (аэрозолей) как естественного, так и искусственного происхождения; эти частицы могут быть как твердыми, так и жидкими (аэрозоли с твердой и жидкой дисперсной фазой) и иметь самые различные размеры. На рис. 14.1 мы приводим сводку характеристик частиц, которые могут находиться в воздухе. Эти частицы во многих случаях ведут себя как динамические системы, причем мелкие частицы агрегируют, образуя крупные, а крупные частицы дробятся на более мелкие (рис. 14.2). Первичной частицей называется такая, размер которой может быть уменьшен далее только разрывом химических связей. Эти частицы могут легко ассоциировать под действием таких сил, как вандерваальсовы силы и электростатическое притяжение. Подобные взаимодействия оказываются существенными для частиц размером 10 мкм и менее, а для частиц больших размеров становятся незначительными по сравнению с другими действующими на них силами, такими, как, например, сила тяжести. Средний диаметр самых мелких частиц,

Рис. 14.1.
Характеристики
и размеры
атмосферных
частиц.



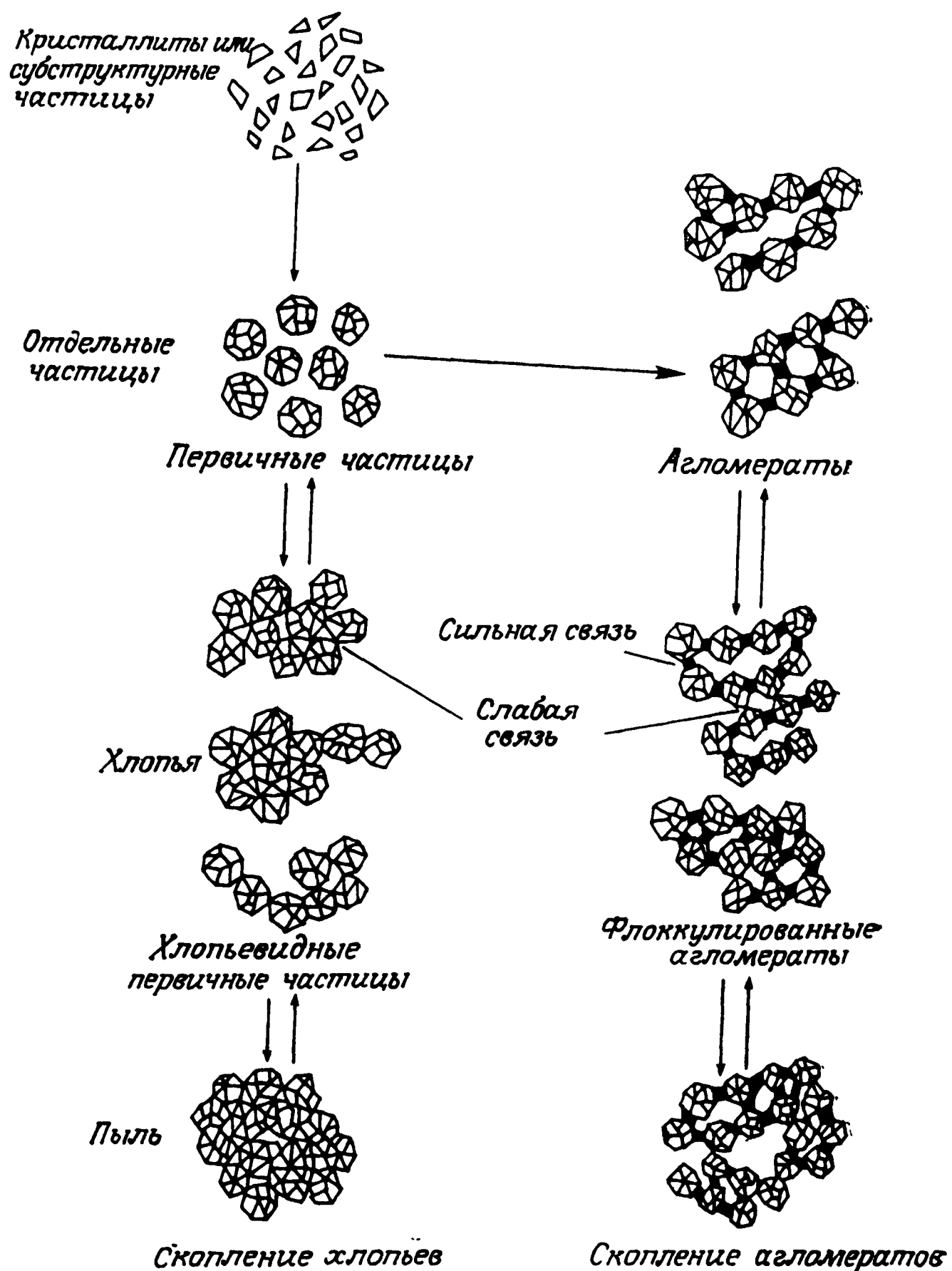


Рис. 14.2. Динамическая природа атмосферных частиц.

которые можно видеть невооруженным глазом, составляет около 20 мкм.

Чтобы описать количественно содержание частиц в атмосфере, необходимо каким-то образом отразить распределение частиц по размерам. Общие способы построения такого распределения показаны на гистограмме, изображенной на рис. 14.3, а. В некоторых случаях предпочтительнее описать распределение частиц по размерам не в виде плотности распределения вероятности, а в виде интегрального распределения (рис. 14.3, б). Распределение частиц по размерам может быть либо унимодальным, с одним пиком на гистограмме, либо бимодальным

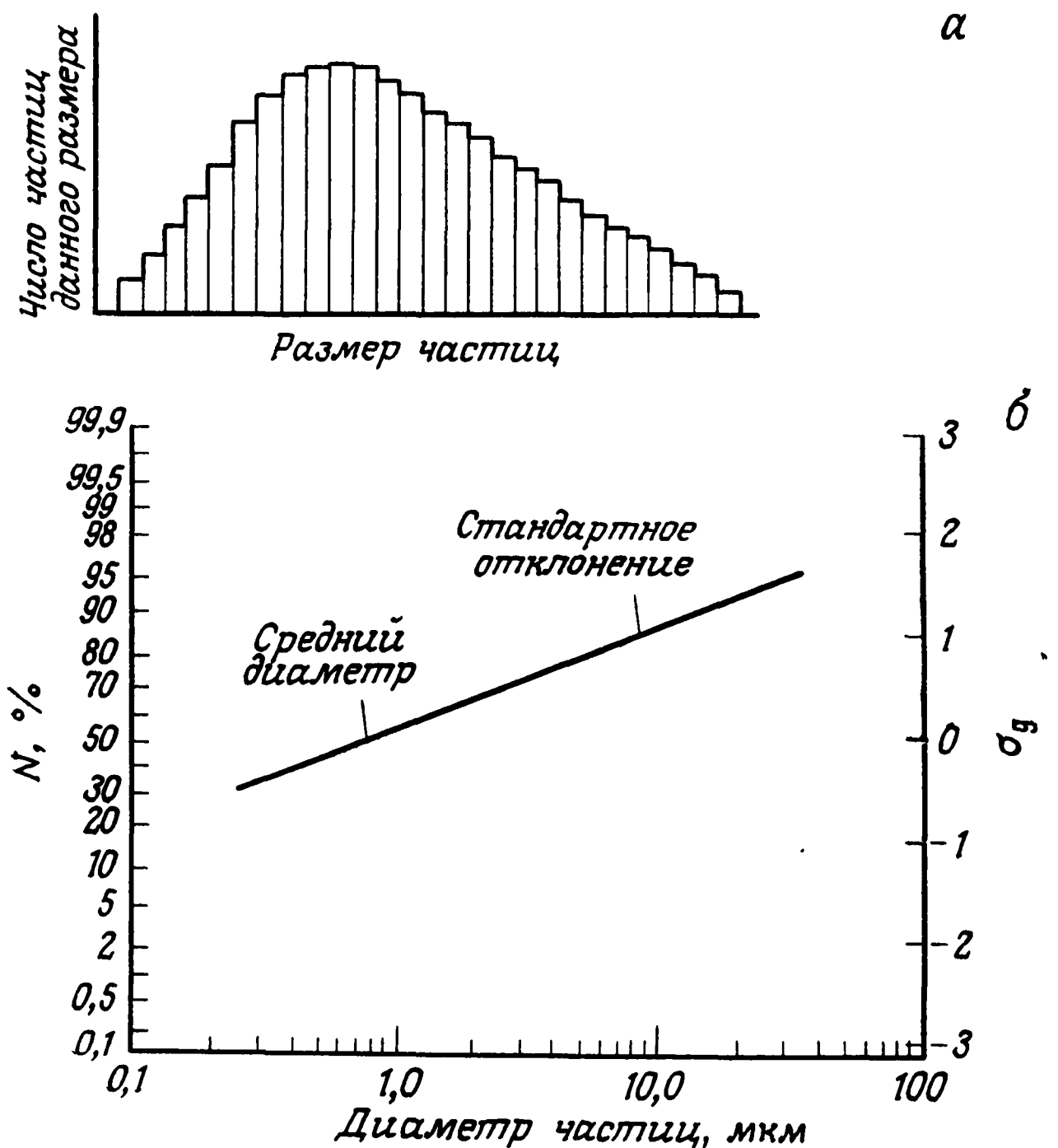


Рис. 14.3. Распределение частиц по размерам в атмосфере. а — плотность распределения вероятности частиц по размерам; число частиц в каждом размерном классе определяется высотой соответствующего прямоугольника; б — интегральная кривая распределения частиц по размерам; слева по оси ординат отложено относительное число частиц N , размер которых не более установленного размера; справа отложено геометрическое стандартное отклонение. Чтобы вычислить геометрическое стандартное отклонение, диаметр пор при стандартном отклонении, равном единице, нужно разделить на средний диаметр.

или полимодальным, если это распределение носит более сложный характер.

Наиболее часто встречается логарифмически-нормальная функция распределения частиц по размерам, которая при построении графика интегрального распределения в полулогарифмическом масштабе дает прямую линию. Если функция распределения частиц является логарифмически-нормальной, то отклонение от среднего значения будет определяться геометрическим стандартным отклонением (σ_g), которое может быть найдено из непосредственного графика для интегральной функции распределения в полулогарифмическом масштабе (рис. 14.3, б). В некоторых случаях функция распределения

может оказаться нормальной, а не логарифмически-нормальной, и тогда разброс распределения дается арифметическим стандартным отклонением (σ). В случае когда распределение либо логарифмически-нормальное, либо нормальное, оно может характеризоваться средним размером частиц и стандартным отклонением. Если же распределение не отвечает ни логарифмически-нормальному, ни нормальному закону, то его графически нельзя просто представить, а необходимо иметь весь набор данных для анализа.

Распределение может быть охарактеризовано размерами частиц, как только что описано, или величиной их массы. Для определенных целей масса частицы оказывается более пригодным параметром, чем ее размер. Так, всегда несколько крупных частиц, которыми можно было бы пренебречь при счете, могут внести большой вклад в общую массу частиц в воздухе. Если же атмосфера содержит большое число очень мелких частиц, то функция распределения их размеров дает завышенное представление об их роли в атмосфере. Что выбрать при окончательном анализе — распределение частиц по массе или по размеру, — будет зависеть от цели исследования. Одни способы улавливания частиц больше основываются на их массах, другие — на их размерах. Процесс мембранной фильтрации в первую очередь определяется размером частиц, но некоторые механизмы их задержки мембранами (основанные главным образом на инерционности частиц) зависят больше от массы частиц, чем от их размера.

В табл. 14.1 приведены некоторые широко распространенные вредные макрочастицы, которые встречаются в атмосфере. Обычно, когда говорят об атмосферных макрочастицах, используют термин **аэрозоль**. Под ним понимают любую дисперсию твердых или жидких частиц в газе. Основная масса большинства естественных аэрозолей обусловлена немногими крупными частицами, так что положение среднемассового размера частиц в таких пробах сдвинуто на гистограмме в сторону бóльших диаметров.

Если речь идет о контроле безопасности персонала, то важно иметь в виду, что в дыхательные пути попадают, как правило, лишь мельчайшие частицы. Как показано на рис. 14.4, более крупные частицы отфильтровываются, прежде чем они достигнут легких, поэтому существует мнение, что значительную опасность для здоровья представляют лишь самые мелкие частицы. Способы, с помощью которых дыхательная система фильтрует атмосферные частицы, являются весьма интересными, но сложными, однако их рассмотрение выходит за рамки данной книги. Краткое обсуждение вопросов контроля безопасности персонала можно найти в работе Линча [140]. Важно

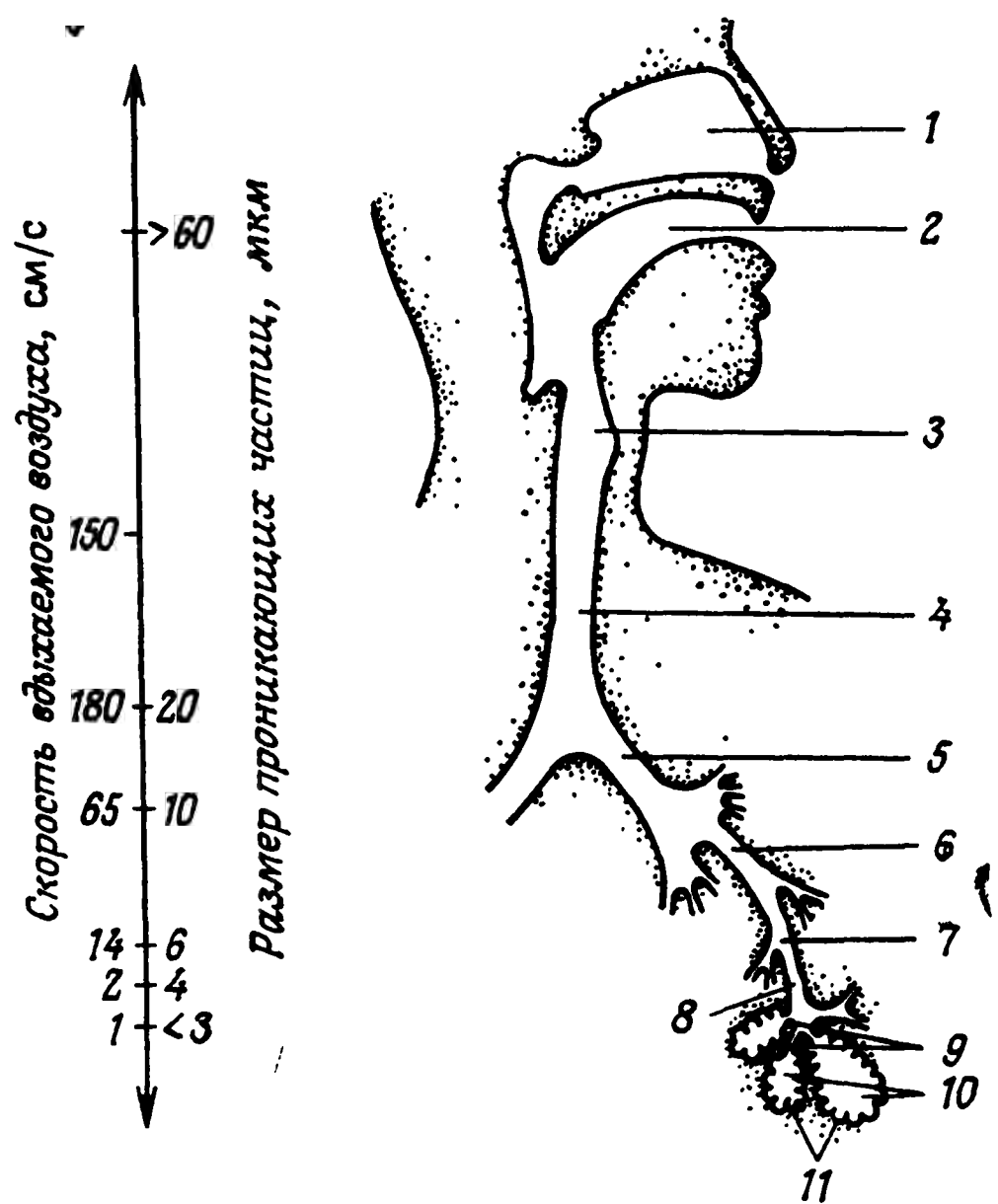


Рис. 14.4. Дыхательная система человека и размеры частиц, проникающих на разную ее глубину. 1 — носовая полость; 2 — ротовая полость; 3 — гортань; 4 — трахея; 5 — первичные бронхи; 6 — вторичные бронхи; 7 — третичные бронхи; 8 — бронхиола; 9 — альвеолярные ходы; 10 — альвеолярные сумки; 11 — альвеолы.

подчеркнуть, что вдыхаемые частицы составляют лишь небольшую долю общей массы атмосферных частиц, и изучение распределения последних по размерам представляет поэтому большое значение при анализе профессиональных заболеваний. Один из наилучших способов оценки распределения аэрозолей по размерам — фракционирование их на калиброванных мембранах Нуклепор, о чем пойдет речь ниже.

Таблица 14.1. Вредные макрочастицы, которые могут находиться в воздухе

Асбестовые волокна	Магнезит
Карбонат кальция	Мрамор
Целлюлоза (бумажное волокно)	Пентаэритрит
Угольная пыль	Алебастр
Хлопковая пыль	Радиоактивные частицы
Корундовая пыль	Абразивный порошок
Наждачная пыль	Дорожная пыль
Стекловолокно	Карбид кремния
Глицерин в виде аэрозоля	Крахмал
Графитовая пыль	Сахароза
Частицы гипса	Окись олова
Кристаллики льда	Двуокись титана
Частицы каолина	Растительные масла
Известняк	

14.3. МЕХАНИЗМЫ ФИЛЬТРАЦИИ ВОЗДУХА

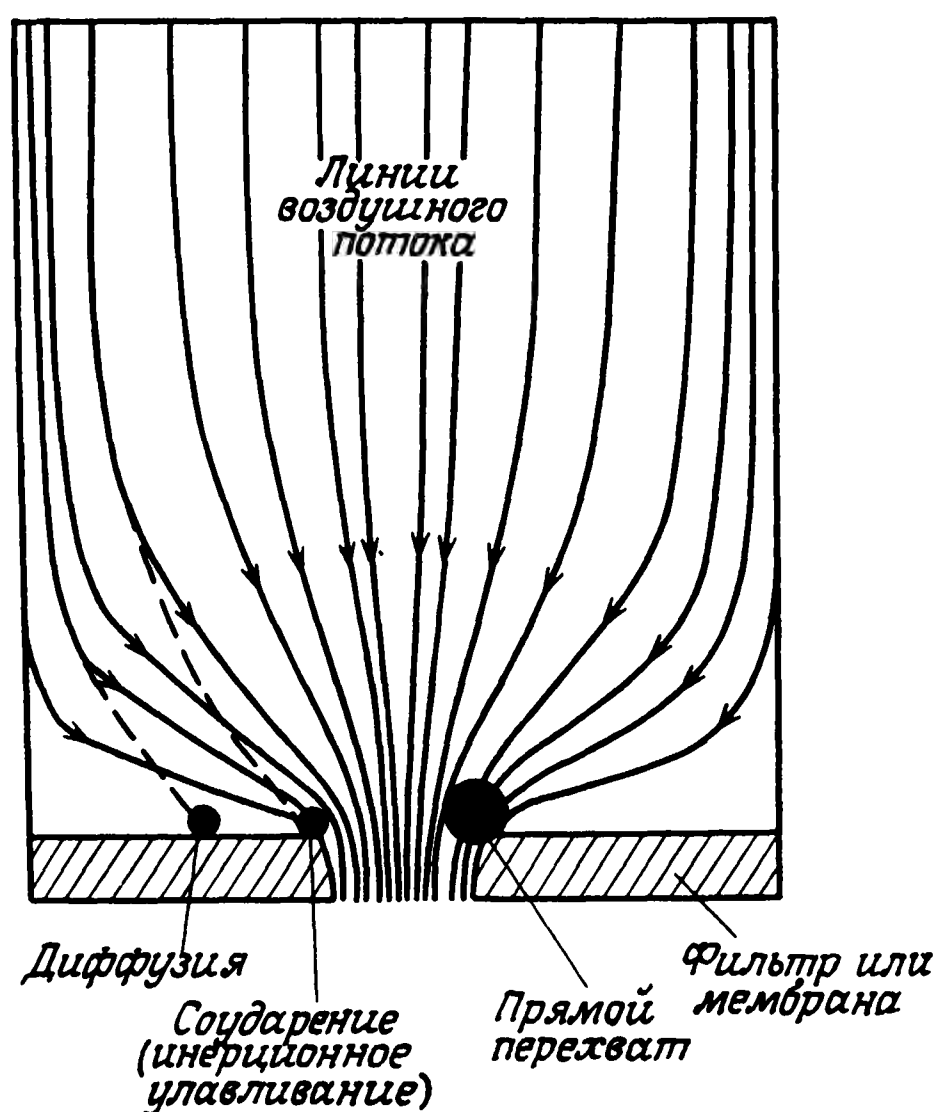
Хотя мембраны и фильтры извлекают частицы из воздуха прямым перехватом точно так же, как и из жидкостей, существуют и другие механизмы извлечения, вызванные тем, что воздух ведет себя в потоке совершенно иначе, чем жидкость. Зададим два главных вопроса: 1. Как частица покидает воздушный поток? 2. Какие силы участвуют в удержании частицы на мембране или фильтре?

Существует несколько механизмов извлечения мембраной частиц: прямой перехват (эффект касания), инерционное улавливание, диффузия, электростатическое притяжение и гравитационное осаждение (седиментация). Были проведены обширные исследования по удалению частиц из воздуха с помощью мембранных фильтров; особенно подробно исследовалось фракционирование по размерам на мембранах Нуклепор. Полный обзор этих работ выполнил Хейдам [97]. Количественные расчеты и теория указанных механизмов имеются лишь для мембран Нуклепор благодаря строгой геометрии их пор, но качественное рассмотрение можно провести также и в случае удаления частиц другими мембранами, применяемыми для фильтрации воздуха.

В процессе фильтрации скорость потока воздуха увеличивается при его поступлении в поры. Скорость воздуха над поверхностью мембраны называется **лобовой скоростью**; она зависит от производительности воздушного насоса и от пористости используемой мембраны. Скорость же, с которой воздух проходит через сами поры, называется **поровой скоростью**. В соответствии с законом Бернулли поровая скорость выше, чем лобовая; на рис. 14.5 показано, как изгибаются линии воздушного потока, когда они достигают поверхности мембраны и входят в поры. Частицы же, взвешенные в воздухе, ведут себя иначе, чем сам воздух, и эта разница в поведении позволяет фильтровать частицы, даже меньшие по сравнению с размерами пор.

Прямой перехват. Частицы, размеры которых больше, чем величина пор, будут задерживаться вследствие прямого перехвата. Кроме того, такой же механизм возможен также для некоторых частиц, меньших, чем размер пор, если их радиус составляет значительную часть радиуса пор. Это объясняется тем, что частицы такого размера, движущиеся с воздушным потоком (по линиям тока газа) вблизи входного отверстия поры, с большой вероятностью могут удариться о поверхность мембраны. На рис. 14.5 большая частица справа от входного отверстия поры была задержана путем прямого перехвата.

Рис. 14.5. Линии воздушного потока, входящего в отверстие поры мембраны Нуклепор, и три механизма задерживания частиц. (Заимствовано с изменениями из работы [97].)



Соударение. Наиболее важным механизмом извлечения частиц диаметром около 1 мкм и выше являются испытываемые ими соударения; этот механизм иногда называют также *инерционным улавливанием*. Благодаря инерции частицы не следуют строго направлению воздушного потока и имеют тенденцию двигаться по прямой, в то время как линии потока воздуха изгибаются. В результате, поскольку такой изгиб происходит вблизи входного отверстия поры, частицы, продолжая двигаться прямо, соударяются с поверхностью мембраны. Соударениям способствуют высокие скорости потока воздуха и малая пористость мембраны (для фильтров — плотная упаковка матрицы).

Диффузия. Этот механизм обуславливает эффекты осаждения только очень мелких частиц. При этом захват частиц идет за счет их броуновского движения и диффузии за счет концентрационных градиентов. Поскольку у поверхности мембраны концентрация частиц вначале равна нулю, возникает концентрационный градиент, который вызывает перемещение частиц из потока воздуха к поверхности мембраны. Диффузии благоприятствуют низкие скорости потока воздуха и высокие концентрационные градиенты. С помощью диффузии улавливаются лишь частицы диаметром меньше 0,1 мкм.

Электростатическое притяжение. Силы электрического взаимодействия возникают благодаря различиям в знаке и величине

заряда поверхностей мембраны и частицы. Согласно Бинеку и Пржиборовски [26], при работе с нитроцеллюлозными мембранными фильтрами в обычных условиях может возникать заряд до $2 \cdot 10^{-9}$ Кл/см², а при трении, возникающем, например, при поглаживании легкой щеточкой, заряд может достигать значения $5 \cdot 10^{-9}$ Кл/см². Заряд, наведенный на поверхностях мембранного фильтра при механических воздействиях такого рода, всегда отрицателен. Поток воздуха сам по себе может также индуцировать заряд на мембране. Благодаря этому положительно заряженные частицы могут быть извлечены из потока воздуха путем электростатического притяжения к поверхности пор мембраны, и, как показали Бинек и Пржиборовски [26], этот механизм действует эффективно для частиц меньше 1 мкм. Однако общепринято считать [97], что электростатическое притяжение играет практически незначительную роль в удалении частиц.

Гравитационные силы. Сила тяжести действует только на очень крупные частицы, и при фильтрации воздуха ею можно пренебречь. Скорость седиментации частиц, представляющих опасность для здоровья, не оказывает существенного влияния на их захват мембранами до тех пор, пока лобовая скорость не станет меньше чем 5 см/с [2].

Задержка частиц на мембране. Если движение частиц в потоке воздуха было прервано, то она подвергается действию адгезии, которая стремится удержать частицу на мембране. Если силы, вызывающие адгезию, превышают силы, обуславливающие отрыв частицы от мембраны, то эту частицу можно рассматривать как «уловленную». Однако если силы отрыва преобладают над силами адгезии, то может произойти повторный унос частицы с мембраны. Адгезия определяется главным образом силами Ван-дер-Ваальса, которые не требуют какого-либо конкретного взаимодействия между частицей и матрицей мембраны. В адгезии участвуют также силы электростатического взаимодействия между положительно заряженными частицами и отрицательно заряженной поверхностью мембраны.

К явлению повторного уноса частиц можно отнести также эффект рикошетирования, т. е. тенденцию частиц отскакивать от поверхности мембраны, что ведет к их потере [97]. Рикошетирование зависит от размера частиц и скорости потока воздуха и играет важную роль для частиц диаметром 1 мкм при скоростях потока выше 80 см/с. Согласно Хейдаму [97], покрытие мембран Нуклепор тонким слоем (около 5 мкг/см²) смазки Апиэзон L (выпускаемая промышленностью смазка, которая образует тонкое покрытие на поверхности мембраны) значи-

тельно замедляет отскок, не влияя в то же время на разделяющие характеристики мембраны.

Забивание пор мембраны происходит в результате «обрастания» поверхности пор частицами. Оно может быть вызвано либо полным блокированием порового отверстия одной крупной частицей, либо постепенным накоплением мелких частиц по краям отверстия, что существенно уменьшает его размер. Спурни и др. [210], а также Фэн и Джентри [71] подробно описали забивание мембран Нуклепор. Количественно забивание выражается в изменении перепада давления по обе стороны мембраны. Для мембран Нуклепор благодаря их малой толщине и, следовательно, коротким поровым каналам перепад давления по обе стороны мембраны очень мал. На первых стадиях забивания мембраны постепенное уменьшение эффективного размера пор приводит к незначительному росту перепада давления, а затем в результате внезапного заполнения пор перепад давлений резко возрастает (рис. 14.6). На конечных стадиях воздух фильтруется через скопления частиц, а не через мембрану, и, поскольку масса этих частиц растет медленно, дальнейший рост перепада давления происходит также медленно. При использовании мембран и фильтров в аналитической работе их забивание не представляет особенно большой проблемы, но с точки зрения эффективного функционирования воздушных фильтров в практической деятельности по очистке воздуха оно, несомненно, играет основную роль.

Эффективность улавливания. Соотношение между эффективностью улавливания частиц и их размерами было подробно исследовано в работах [97, 210]. Как видно из рис. 14.7, эффективность улавливания оказывается наибольшей для очень мелких и очень крупных частиц и наименьшей для частиц размером 0,05—0,10 мкм. Если для оценки размеров частиц используются такие хорошо откалиброванные мембраны, как Нуклепор, то существенно, чтобы с достаточной эффективностью количественно разделялись частицы любых размеров¹. В табл. 14.2 приведены данные об измерениях эффективности мембран Нуклепор, а также ряда целлюлозных мембран и фильтров из стекловолокна. На эффективность работы мембранных фильтров наибольшее влияние оказывает величина лобовой скорости, причем наилучшая эффективность улавливания получается при малой

¹ Из рис. 14.7 и табл. 14.2 следует, что задерживающая способность мембран Нуклепор для мелких и крупных частиц примерно одинакова. Поэтому к рассуждениям автора о возможности использования трековых мембран для фракционирования частиц аэрозолей по размерам следует относиться с известной долей осторожности.— *Прим. ред.*

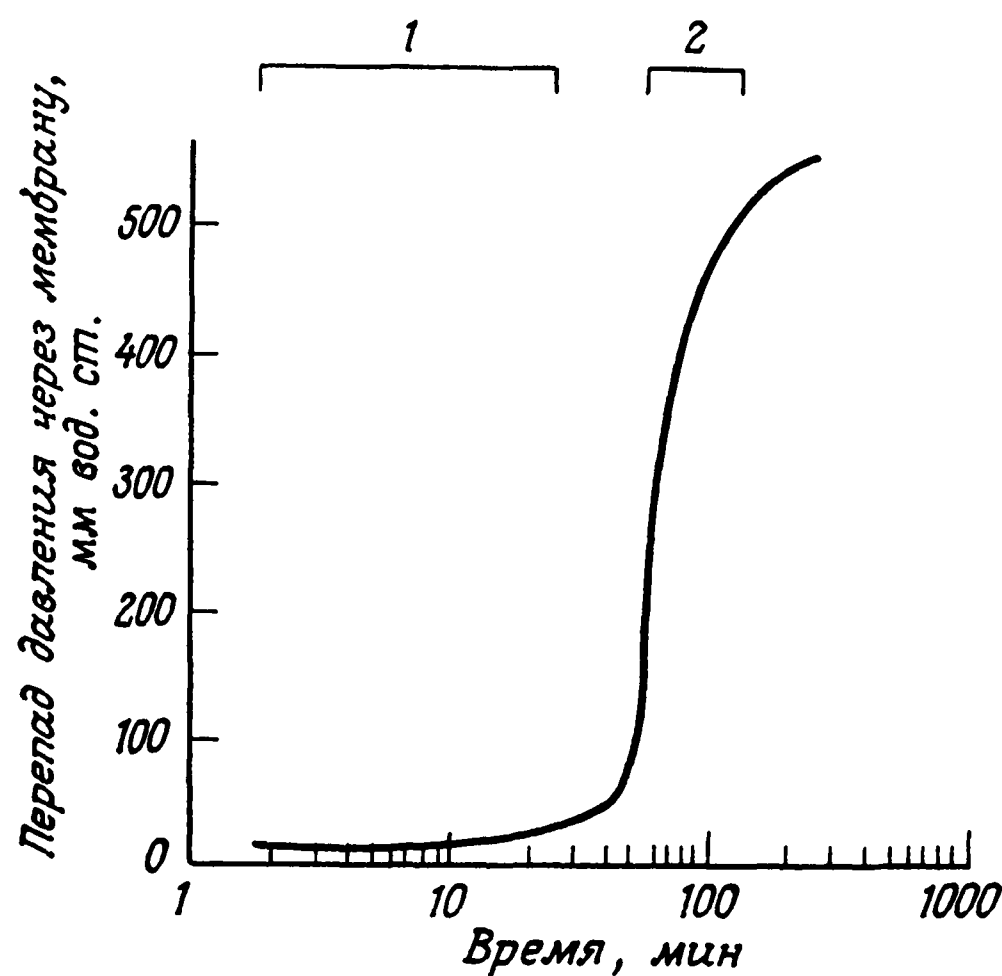


Рис. 14.6. Забивание мембраны при фильтрации воздуха. Забивание количественно характеризуется изменением перепада давления через мембрану. При сохранении постоянной скорости воздушного потока разница в величинах давления по обе стороны мембраны служит мерой ее забивания. При забивании пор мембраны, для того чтобы скорость потока воздуха сохранить постоянной, требуется больший перепад давления. 1 — постепенное уменьшение размера отверстия поры; 2 — полное заполнение частицами отверстия поры.

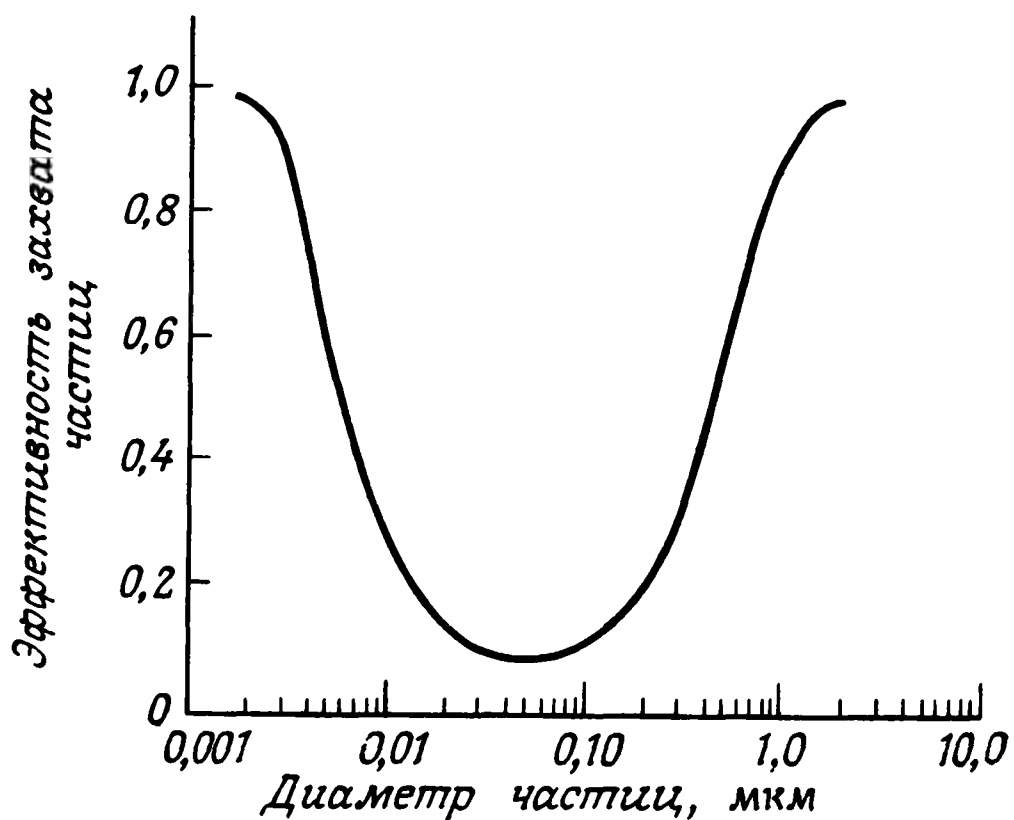
лобовой скорости, равной примерно 1 см/с или меньше. Однако в действительности эффективность улавливания зависит сложным образом как от лобовой скорости, так и от размера пор, и

Таблица 14.2. Эффективность улавливания аэрозольных частиц различными мембранами и фильтрами [210]

Тип фильтрующего материала	Диаметр пор, мкм	Давление, мм вод. ст.	Эффективность улавливания	
			частицы 0,03 мкм	частицы 0,3 мкм
Нуклепор	0,5	701	0,987	0,993
	0,8	698	0,946	0,619
	1,0	127	0,868	0,522
	2,0	56	0,433	0,283
	5,0	35	0,184	0,144
	8,0	65	0,057	0,101
Миллипор НА	0,45	418	0,999	0,988
Миллипор АА	0,8	260	0,999	0,973
Гелман Акропор	0,8	51	0,993	0,970
Миллипор ОН	1,5	607	0,872	0,511
Миллипор SS	3,0	97	0,999	0,912
Миллипор OS	10,0	28	0,634	0,312
Гелман, стекловолокно		688	0,999	0,990
Ватман, стекловолокно		48	0,589	0,244

¹⁾ Эффективность улавливания частиц фильтрующим материалом выражена в виде отношения количества уловленных частиц к количеству подводимых частиц. Данные приведены для частиц двух размеров: 0,03 и 0,3 мкм. Величина перепада давления выражена в мм водяного столба. Скорость потока (она же лобовая скорость) поддерживалась постоянной и равной 5 см/с.

Рис. 14.7. Эффективность, с которой частицы различных размеров задерживаются мембранами Нуклепор с порами 5 мкм. Эффективность выражается как отношение числа уловленных мембраной частиц к числу частиц, находившихся в исходной пробе воздуха. (Кривая построена на основании данных работы [210].)



существует оптимальная лобовая скорость для дискриминации различных частиц по размерам. Таким образом, хотя фракционирование по размерам может быть осуществлено с помощью набора мембран Нуклепор, действующих совместно как одно устройство, причем воздух проходит последовательно от одной мембраны к другой, использование отдельных мембран Нуклепор позволяет провести даже более тонкую дискриминацию, если подобрать для каждой мембраны с определенным размером пор оптимальную лобовую скорость. В этом последнем способе дискриминации частиц следовало бы пользоваться для частиц каждого размера индивидуальной схемой отбора проб. Более подробно этот вопрос рассматривают Спурни и др. [210, 211], а также Хейдам [97].

14.4. ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ОТБОРА ПРОБ ВОЗДУХА

Для фильтрации воздуха с применением мембранных фильтров выпускается различное оборудование. Для выполнения аналитической работы (например, для анализа загрязнения воздушной среды) пригодны достаточно простые системы. На рис. 14.8 изображены основные компоненты такой системы; они включают в себя воздуходувное устройство (например, вакуумный насос), средства, регулирующие скорость потока воздуха (например, вентиль или ограничительный жиклер), расходомер (для замера объема отфильтрованного воздуха), фильтродержатель с вложенным мембранным фильтром и пробоотборник. Необходимо, чтобы компоненты системы были расположены в последовательности, указанной на рис. 14.8, причем пробоот-

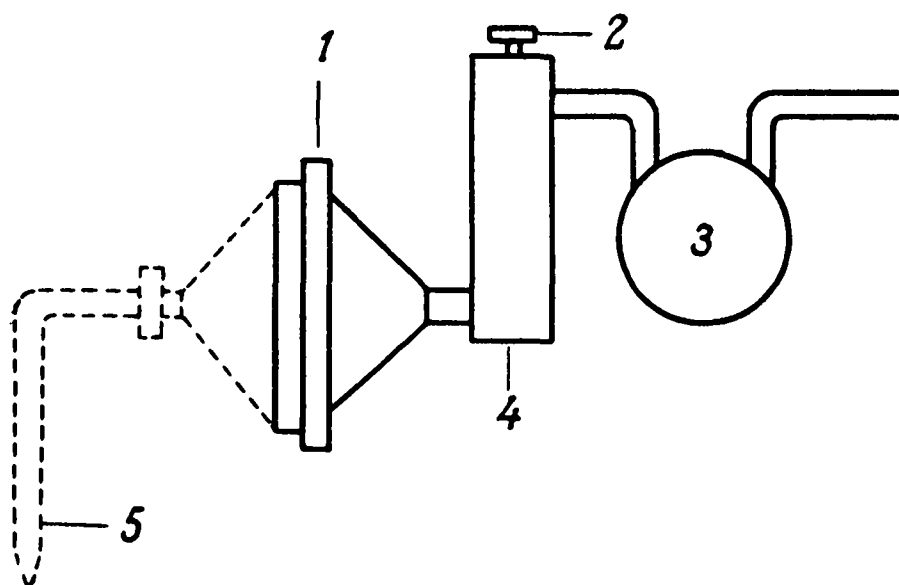


Рис. 14.8. Компоненты системы для отбора проб воздуха. 1 — фильтродержатель; 2 — вентиль; 3 — воздушный насос; 4 — расходомер; 5 — пробоотборник. Пробоотборник используется для взятия проб в дымовых или иных трубах (см. рис. 14.9), но не на открытом воздухе. (Основано на работе [2].)

борник и мембрана должны находиться как можно ближе к анализируемому источнику воздуха, с тем чтобы никакие загрязнения от насоса или шлангов не попали случайно на мембрану.

При взятии проб из потока воздуха важно следовать процедуре, известной как **изокинетический отбор**. Это означает, что отбор каждой пробы должен производиться в таких условиях, чтобы у частиц не изменилась величина количества движения, прежде чем они не достигнут мембраны. Изокинетический отбор играет особенно важную роль в тех случаях, когда в качестве пробы используется не весь поток воздуха, а лишь представительный его образец. Для выполнения изокинетического отбора в поток воздуха (движущегося в какой-либо трубе) вводят тонкостенную трубку пробоотборника (рис. 14.8) таким образом, чтобы ее ось была направлена вдоль потока воздуха, как показано на рис. 14.9. Неправильная установка пробоотборника приведет к искажениям при сборе частиц (рис. 14.10). Изокинетический отбор особенно важен при отборе частиц большого диаметра. Как правило, частицы диаметром меньше 3 мкм не требуют изокинетического отбора, поскольку масса таких частиц слишком мала, чтобы инерционные эффекты играли какую-то роль. Изокинетический отбор не требуется также в случае, когда пробу берут на открытом воздухе в безветренную погоду, поскольку частицы воздуха движутся столь медленно, что их инерцией можно пренебречь.

Процедура отбора зависит главным образом от характера анализируемой воздушной среды. При большом загрязнении воздуха необходимо производить отбор в источниках загрязнения, например в дымовых трубах. Это весьма сложная задача, поскольку точность и эффективность процедуры взятия пробы зависит от местоположения и ориентации пробоотборника. Подробное описание процедуры отбора проб в источниках загрязнения выходит за рамки настоящей работы; читатель, желающий получить представление об этой области исследований,

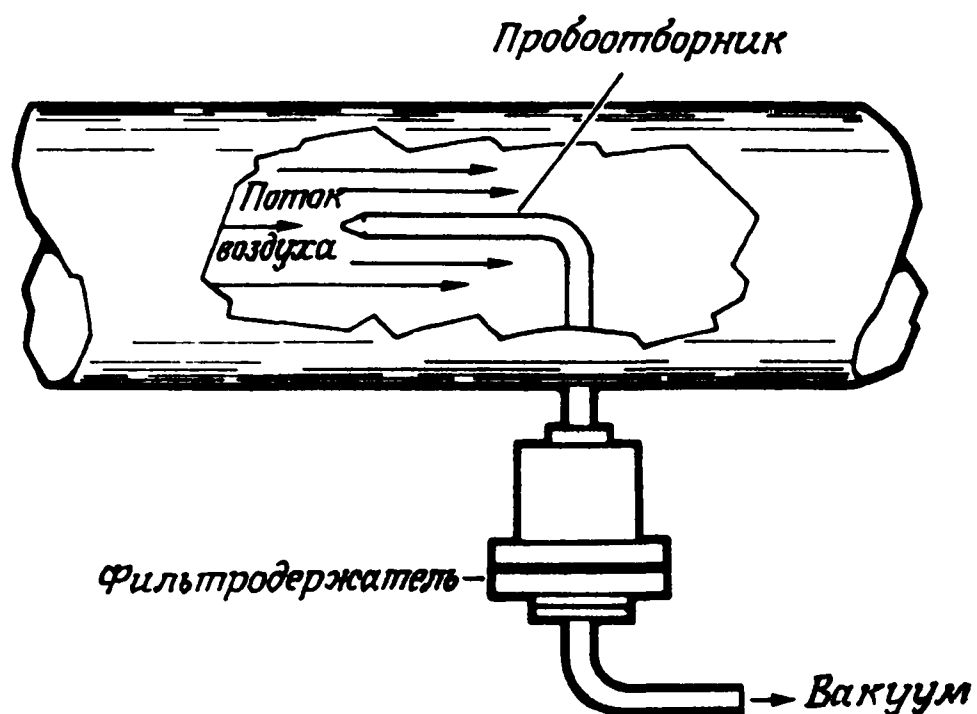


Рис. 14.9. ИзокINETический отбор проб в потоке воздуха. Показано устройство пробоотборной трубки при взятии пробы воздуха в дымовой трубе. (Основано на стандарте ASTM F25.)

может обратиться к рекомендациям Американской ассоциации здравоохранения [2].

Фильтродержатели, пригодные для мембранной фильтрации газов, изготавливаются рядом фирм, выпускающих мембранные фильтры. Имеются фильтродержатели как замкнутого типа — для установки в газовых «шлейфах», так и открытого типа — для взятия проб на открытом воздухе (рис. 14.11). Для фракционирования частиц по размерам, когда применяют наборы мембран и фильтров, некоторые фирмы-изготовители выпускают комплекты фильтродержателей. Соответствующее лабораторное оборудование для большинства процессов мембранной фильтрации воздуха выпускается фирмами «Миллипор», «Нуклепор», «Сарториус», «Шляйхер и Шуль» и «Гелман». Фильтродержатель должен соответствовать размеру используемой мембраны и должен хорошо уплотнять ее по краю. Помимо экранирующей сетки, располагающейся над мембраной и необходимой для выравнивания ее поверхности, под мембрану желательно поместить диск из тонкой целлюлозной бумаги. Тогда не будет сомнений в том, что всю поверхность мембраны омывает равномерный поток газа. Равномерное прохождение газа через мембрану особенно важно при последующем микроскопическом ее исследовании (см. гл. 8), поскольку в этом случае, как правило, анализируют лишь незначительную часть поверхности мембраны.

Скорость газового потока должна быть точно известна. Для измерения скорости течения можно использовать реометры, но в период отбора проб их необходимо регулярно проверять, чтобы быть уверенным в том, что скорость потока остается неизменной. При забивании мембраны происходит рост перепада давления (см. рис. 14.6), приводящий к изменению скорости потока. Очевидно, реометр нужно располагать за мембраной, чтобы он не задержал ни единой частицы из воздуха, прежде

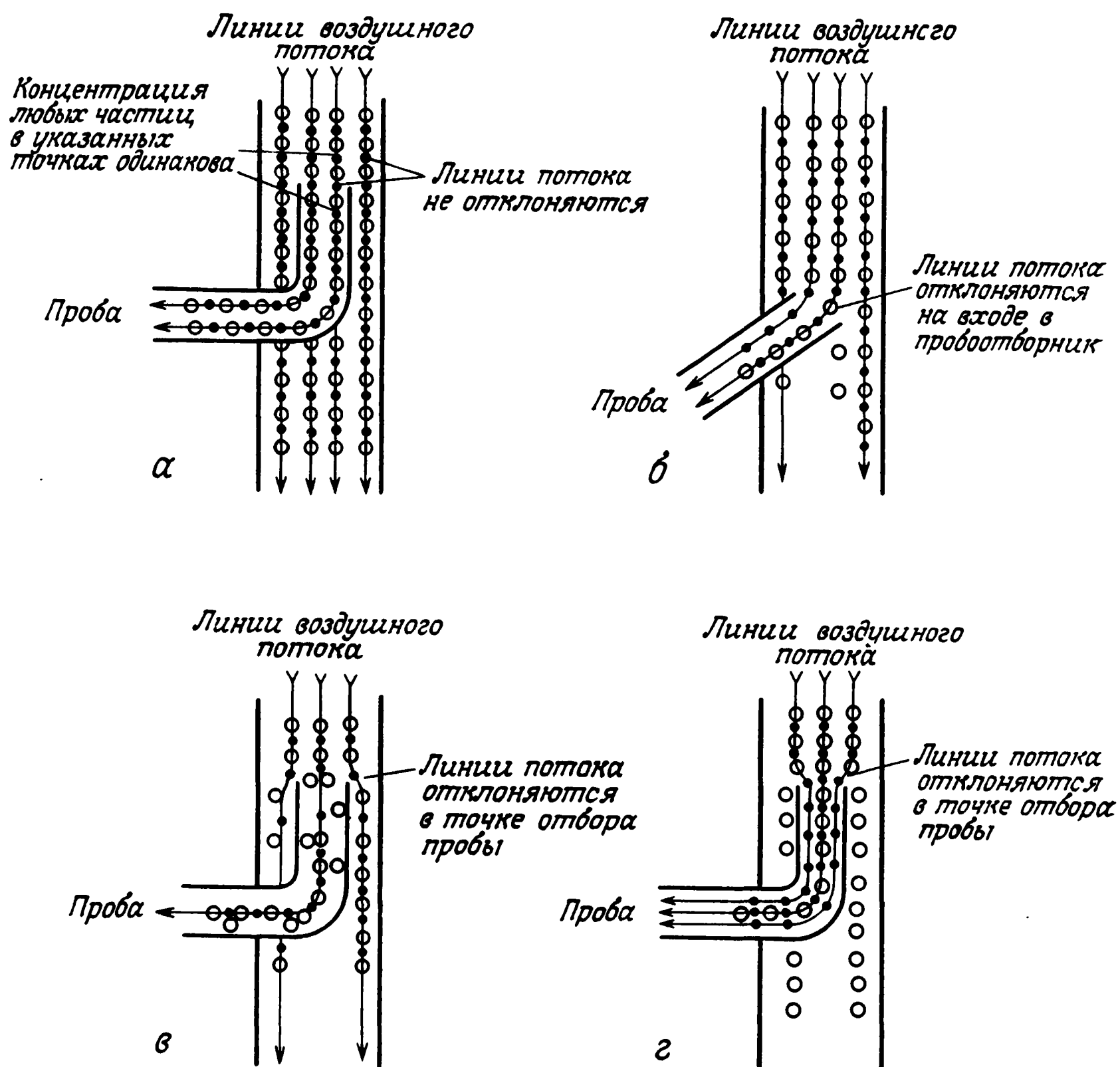


Рис. 14.10. Правильное и неправильное расположение пробоотборника при взятии пробы в потоке воздуха, движущегося в трубе. а — изокINETический отбор; б — пробоотборная трубка не на месте; неизокINETический отбор; в — слишком низкая скорость работы насоса; неизокINETический отбор; г — слишком высокая скорость работы насоса; неизокINETический отбор. (На основании рекомендаций Американской ассоциации здравоохранения [2].)

чем она не достигнет мембраны. С целью регулирования потока в случае небольших аппаратов для взятия проб можно использовать такое устройство, как *ограничительный жиклер* (насадка с калиброванным отверстием, регулирующая поток газа), выпускаемый фирмой «Миллипор» и некоторыми другими фирмами-изготовителями. В табл. 14.3 представлены характеристики некоторого набора жиклеров производства фирмы «Миллипор». По достижении требуемого вакуума поток через жиклер и всю установку становится постоянным и определяется калибром жиклера. Все, что необходимо для функционирования такой системы, — это вакуумный насос с производитель-

Рис. 14.11. Фильтродержатель, используемый при отборе проб воздуха. Под мембраной, плотно установленной между двумя секциями фильтродержателя, располагается тонкая прокладка из целлюлозы, предназначенная для равномерного распределения воздушного потока над поверхностью мембраны. Между верхней и нижней частями фильтродержателя расположена центральная секция с кольцом, удерживающим мембрану при отборе проб на открытом воздухе. При взятии проб в замкнутом пространстве трубка пробоотборника подсоединяется непосредственно к верхней части фильтродержателя. (Фото любезно предоставлено фирмой «Миллипор».)



ностью, достаточной для поддержания определенного вакуума.

Другое важное замечание состоит в том, что в системе фильтрации воздуха не должно быть течи. Любая течь приведет к неправильной фильтрации, нарушению скорости потока или к потере частиц.

Когда производится отбор проб воздуха или газа, текущего по газопроводам или трубам (изокинетический отбор), не-

Таблица 14.3. Жиклеры, производимые фирмой «Миллипор корпорейшн» и предназначенные для регулирования скорости потока при отборе проб воздуха

Скорость потока через отверстие жиклера, л/мин	Минимальный требуемый вакуум, мм рт. ст.	Скорость потока через отверстие жиклера, л/мин	Минимальный требуемый вакуум, мм рт. ст.
1,0	300	4,9	400
2,0	300	10,0	500
3,0	300	14,0	550

В таблице все величины приведены с точностью 15%. Для большей точности жиклер следует откалибровать по реометру в условиях, соответствующих рабочим.

обходимо знать скорость потока той газовой среды, откуда должна быть взята проба. Для измерения этой скорости лучше всего воспользоваться трубкой Пито, состоящей из двух концентрических трубок, одна из которых обращена отверстием навстречу потока, а другая располагается перпендикулярно потоку. Разница давлений между этими двумя трубками позволяет измерить скорость потока газа (Американская ассоциация здравоохранения [2]).

Заметим, что вакуумные насосы часто выделяют масляную дымку или туман, которые могут привести к загрязнению фильтрующей системы. Следует проявлять особую осторожность, чтобы избежать использования в фильтрующей установке или в непосредственной близости к ней всего, что может внести загрязнение. Выхлопные газы автомобиля, дождь и другие внешние факторы могут привести к тому, что результаты измерений окажутся неверными. Большинство мембран и фильтров, используемых в фильтрации аэрозолей, могут выйти из строя при попадании на них влаги.

Время, затрачиваемое на фильтрацию при отборе проб, определяется уровнем загрязнения анализируемого газа и количеством вещества, которое нужно собрать для анализа. Если должен быть проведен гравиметрический анализ, потребуется больше времени, чем в том случае, когда необходимо провести химический или микроскопический анализ. Американское общество по испытаниям материалов в Стандарте D 2009 дает номограмму, которая указывает время, необходимое для сбора пробы массой 10 мг при различных скоростях газового потока в зависимости от уровня загрязнения атмосферы. Согласно этой номограмме, время взятия пробы колеблется от нескольких до сотен часов, что дает некоторое представление о его продолжительности в типичной ситуации. Когда отбор пробы завершен, мембрану или фильтр необходимо немедленно удалить из фильтрующей установки и поместить в закрытый сосуд для последующего анализа. Если необходимо провести гравиметрический анализ, контейнер перед использованием следует взвесить (разумеется, масса мембраны или фильтра перед фильтрацией должна быть также известна). Ниже в этой главе мы рассмотрим более подробно анализ вещества на мембранных фильтрах.

При любом анализе загрязнения воздуха самое большое внимание должно быть уделено правильному отбору пробы воздуха, чтобы результаты имели какую-то реальную значимость и пользу. Основные принципы отбора воздушных проб, включая статистическую обработку, учет метеорологических и топографических факторов, выбор метода взятия пробы и то, как следует установить соответствующую аппаратуру, можно найти в Стандарте ASTM D 1357.

14.5. ФИЛЬТРУЮЩИЕ МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ФИЛЬТРАЦИИ ВОЗДУХА

Термин «материал» относится к любой твердой матрице, которую можно поместить на пути газового потока, чтобы уловить частицы или примеси загрязняющих газов. Различные ма-

териалы для фильтрации воздуха использовались в течение длительного времени как для практической фильтрации больших объемов воздуха (например, для кондиционирования и нагревания воздуха в автомобильных двигателях), так и для проведения аналитической работы. Как мы уже отмечали, промышленное производство мембранных фильтров было предпринято, когда была обнаружена их очевидная польза для анализа загрязнения воды, но уже давно стало ясным и то, что их можно также использовать и для анализа воздуха. Фирма «Миллипор компани» в течение ряда лет выпускает на рынок мембранные фильтры со средним диаметром пор 0,8 мкм, обозначаемые АА («аэрозольный анализ») и предназначенные для контроля за загрязнением воздуха, в то время как для анализа воды она выпускает мембраны со средним диаметром пор 0,45 мкм, которые имеют маркировку НА («гидрозольный анализ»). Самое большое достоинство мембранных фильтров состоит в их очень высокой эффективности при улавливании небольших частиц, и именно благодаря этому их свойству они нашли столь широкое применение в анализе загрязнения воздушной среды. Ниже в этом разделе мы обсудим как преимущества, так и некоторые недостатки мембранных фильтров, применяющихся для этих целей.

Подробное рассмотрение фильтрующих материалов, пригодных для изучения загрязнения воздушной среды, приведено в рекомендациях американской ассоциации здравоохранения [2]. Фильтрующие материалы можно разделить на три основные группы: волоконные фильтры, традиционные мембраны сетчатого типа и мембраны Нуклепор. Дольше всех и наиболее широко используются волоконные фильтры. В сущности для создания фильтра можно использовать любое волокно, изготовив из него плетеную ткань того или иного рода. Для изготовления волоконных фильтров, предназначенных для фильтрации воздуха, в отличие от тех, которые применяют при фильтрации воды, можно использовать значительно больше различных материалов, поскольку силы, участвующие в извлечении частиц, различаются для этих двух сред (см. разд. 14.3). Волоконные фильтры допускают существенно более высокие скорости потока, чем мембранные, но во многих случаях обладают намного меньшей эффективностью задержки и непригодны для микроскопического анализа.

Традиционные мембранные фильтры сетчатого типа способны улавливать значительно меньшие по размеру частицы, чем многие волоконные фильтры. Главным их преимуществом является малая масса самой мембраны, что позволяет с большей точностью проводить гравиметрический анализ. Некоторые мембранные фильтры полностью растворимы в органических

растворителях, так что уловленные ими частицы легко выделить. Наконец, ровная поверхность мембранного фильтра очень удобна для непосредственного микроскопического анализа частиц на мембране (см. разд. 8.8 и 8.9). Именно последнее обстоятельство было причиной первого широкого применения мембранных фильтров в фильтрации воздуха, и в настоящее время разработан ряд стандартных методов для микроскопического анализа частиц [2, 156]. При этом большое преимущество заключается в том, что микроскопия может быть проведена без переноса частиц в другую среду, т. е. без какого-нибудь изменения их состояния или формы. Ровная поверхность мембранных фильтров и малая глубина проникновения частиц в их матрицу сделали эти материалы очень удобными для сбора слаборадиоактивных частиц. Например, источники α -частиц нельзя анализировать на волоконных фильтрах, поскольку матрица фильтра поглощает радиоактивное излучение и тем самым препятствует обнаружению α -частиц с помощью радиационного счетчика. Мембранные фильтры широко применяются для анализа загрязнения воздуха частицами, содержащими источники α -излучения.

Недостатков у мембранных фильтров несколько. Тот факт, что все частицы собираются на ровной поверхности, означает, что, до того как произойдет забивание мембраны, может быть собрано лишь ограниченное количество этих частиц. Традиционные мембранные фильтры, как правило, не ведут себя как сита; они задерживают частицы, много меньшие чем средний размер их пор, и поэтому их нельзя применять для определения размера частиц. Это было обнаружено еще на раннем этапе использования мембранной фильтрации; этот вопрос мы уже рассматривали в разд. 14.3 с точки зрения механизмов фильтрации воздуха. Другой крупный недостаток мембранных фильтров состоит в том, что они намного чувствительнее к экстремальным условиям, таким, как высокие температуры и коррозионная среда, чем большинство волоконных фильтров. Поэтому их нельзя использовать во многих отраслях промышленности, где могут с успехом применяться стекловолоконные и асбестовые фильтры.

Некоторыми важными достоинствами с целью фильтрации воздуха обладают мембраны Нуклепор. Такие мембраны ведут себя по существу как сита, и поэтому их можно применять для анализа размера частиц [97, 211]. Они исключительно тонкие, намного тоньше, чем обычные мембранные фильтры, вследствие чего они имеют небольшую массу, а это играет важную роль при гравиметрическом анализе, и имеют невысокое сопротивление газовому потоку, измеряемое перепадом давления по обе стороны мембраны. Они почти прозрачны, даже без иммерсион-

ного масла, так что в некоторых случаях можно применить прямую микроскопию. Кроме того, благодаря своей прозрачности они могут использоваться в разнообразных спектроскопических измерениях непосредственно в проходящем свете. Из-за большей устойчивости к растворителям поликарбонатной матрицы мембран Нуклепор по сравнению с эфирами целлюлозы, на основе которых изготавливаются традиционные мембраны, первые лучше подходят для некоторых анализов при фильтрации воздуха. Поскольку эти мембраны имеют гладкую поверхность, они лучше всего подходят для сканирующей электронной микроскопии.

Другой тип мембранных фильтров, нашедший особое применение в работах по фильтрации воздуха, — **серебряные мембраны**. В разд. 3.8 мы упоминали о том, что эти мембраны состоят из мельчайших частиц серебра, сплавленных вместе с образованием пористой структуры. Никаких связующих агентов не используется. Достоинство серебряных мембран заключается в их высокой термической стойкости, благодаря чему они могут работать при температурах до 400 °С. Следовательно, серебряные мембраны годятся для анализа очень горячих газов; в этих условиях другие мембраны или фильтры были бы разрушены. Их можно применять и при более низких температурах, при весовом анализе частиц в газовых потоках такого состава, который вызвал бы у обычных фильтрующих материалов большие потери в массе. Однако следует заметить, что серебряные мембраны не выдерживают действия на них таких химических агентов, как цианиды и сероводород.

14.6. ПРОВЕРКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕМБРАН, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ ВОЗДУХА

Эффективность задержки частиц мембранами, используемыми при фильтрации воздуха, принято характеризовать величиной прохождения через мембрану частиц стандартного аэрозоля. Для испытаний обычно используют аэрозоли, содержащие шарики полистирольного латекса, кристаллы хлористого натрия, дорожную пыль и капельки диоктилфталата (ДОФ). С помощью ДОФ можно получить аэрозоль с каплями одного и того же размера, что позволяет оценить эффективность мембран по отношению к частицам данной величины. В качестве стандарта для проверки эффективности мембран, используемых для фильтрации воздуха, применяют аэрозоли ДОФ с частицами диаметром 0,3 мкм. Стандартное оборудование для получения аэрозоля ДОФ имеется в про-

даже и подходит для текущей проверки мембран. Дополнительные сведения по измерению эффективности задержки см. в рекомендациях Американской ассоциации здравоохранения [2].

14.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОЗДУХЕ

Тот факт, что микробы переносятся воздушным путем, известен со времен Луи Пастера. Во многих случаях необходимо знать, как велико содержание микроорганизмов в воздухе. Мембранные фильтры применялись для анализа содержания в воздухе пылицы или микробных спор прямой фильтрацией на мембранах с диаметром пор 0,8 мкм. Споры грибов или пыльца могут быть идентифицированы и подсчитаны методом прямой микроскопии, но к спорам бактерий из-за небольших их размеров должен быть применен упоминавшийся ранее метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов. Неспоровые бактериальные клетки на мембране быстро обезвоживаются, и поэтому их нельзя собрать для такого подсчета на поверхности сухой мембраны. Поэтому для анализа содержания неспоровых клеток в воздухе были использованы специальные приспособления для улавливания их жидкостью, которую затем пропускали через мембранный фильтр, чтобы сконцентрировать собранные микроорганизмы [182]. После этого мембрану можно поместить в питательную среду, как обычно (см. гл. 9), или исследовать под микроскопом (см. гл. гл. 8).

Более прямой подход состоит в том, чтобы задерживать микроорганизмы непосредственно на мембране, которая впоследствии будет подвергнута изучению. Для улавливания микроорганизмов с их выращиванием в питательной среде и последующим подсчетом (см. гл. 9) были использованы обычные мембранные фильтры с диаметром пор, как правило, 0,8 мкм. Хотя этот метод является простым и широко распространенным, у него есть несколько недостатков.

- Значительная часть микроорганизмов погибает на мембране в процессе фильтрации, очевидно, из-за того, что микроорганизмы подвергаются при этом сильному обезвоживанию.

- Для каждой мембраны требуется своя питательная среда, вследствие чего невозможно при одноразовой фильтрации воздуха идентифицировать две или более группы микроорганизмов, которым необходимы различные условия для роста.

- Невозможно проконтролировать содержание микроорганизмов в пробе. Уловленные мембраной микроорганизмы не

могут быть легко удалены с нее для дальнейшего выращивания. Если их содержание слишком высоко, то колонии бактерий могут слиться на поверхности мембраны, что делает результаты эксперимента недостоверными.

Мембранные фильтры из желатины. Только что упомянутые затруднения, связанные с обычными мембранными фильтрами, могут быть отчасти преодолены использованием мембранных фильтров из желатины. Эти мембраны, производимые фирмой «Сарториус», по своей структуре сходны с обычными мембранными фильтрами, но обладают тем уникальным свойством, что растворяются в воде. После того как бактерии уловлены на мембране, ее растворяют в физиологическом солевом растворе или фосфатном буфере, а порции образовавшейся суспензии могут быть выращены в чашках на различных средах или при различных разбавлениях. Гибель микроорганизмов, характерная для обычных мембранных фильтров, не столь велика в случае мембран из желатины.

Коллер и Роттер [129] провели детальное исследование полезности применения желатиновых мембран в методе подсчета жизнеспособных бактерий в воздухе. Эти авторы представили также некоторые данные о физических свойствах желатиновых мембран. Шуерманн [181] опубликовал работу, в которой основное внимание уделено использованию желатиновых мембран в фармацевтической промышленности и определению функции боксов с ламинарным потоком. Фирма «Сарториус компани» (ФРГ; адрес см. в гл. 5) может выслать документацию, в которой подробно описываются способы растворения мембран и методы культивирования.

Желатиновые мембраны фирмы «Сарториус» имеют толщину 250 мкм и диаметр 50 мм. Они выпускаются стерилизованными окисью этилена, хотя для их стерилизации можно использовать также гамма- или ультрафиолетовое излучение. По своей внутренней структуре они аналогичны обычным мембранным фильтрам с 80 %-ной пористостью и плотностью пор около 10^7 см⁻². Основной размер пор, определенный методом продавливания ртути, составляет 0,3 мкм, но благодаря силам электростатического притяжения эти мембраны улавливают бактерии много меньших размеров. Согласно литературным данным, желатинные мембраны задерживают 99,98—99,99 % жизнеспособных бактерий. Коллер и Роттер [129] для подсчета частиц в воздухе использовали счетчик до и после пропускания потока воздуха через желатиновые мембраны и показали, что задерживается 99,954 % частиц диаметром 0,5—1,0 мкм и 99,967 % частиц диаметром 1,6—3,0 мкм. Шуерманн [181] показал, что воздух можно пропускать через эти мем-

браны со скоростью $2,7 \text{ л/}(\text{мин} \cdot \text{см}^2)$ при перепаде давления 500 мм рт. ст. При фильтрации в течение 5—60 мин выход жизнеспособных микроорганизмов на обычных целлюлозных мембранах был примерно на 25 % ниже, чем на желатиновых.

Отбор проб воздуха для подсчета жизнеспособных микроорганизмов должен проводиться в соответствии с принципами, описанными ранее в этой главе (изокинетический отбор, предосторожности против загрязнений системой подачи воздуха и т. д.) и дополненными мерами по обеспечению стерильности пробоотборника и его держателя. Шуерманн [181] рассматривает некоторые детали взятия проб в фармацевтически чистых помещениях. После фильтрации мембрану с бактериями переносят в асептических условиях в стерильный стакан, снабженный магнитным стержнем для перемешивания, и добавляют 50 мл теплого (температура $30\text{—}35^\circ\text{C}$) стерильного физиологического солевого раствора. Стакан накрывают стерильной крышкой от чашки Петри и помещают в водяную баню (температура $30\text{—}35^\circ\text{C}$) по меньшей мере на 20 мин, периодически извлекая его, чтобы подсоединить к мотору, запускающему магнитную мешалку. Растворение мембраны можно ускорить с помощью нескольких стеклянных бусин. После того как мембрана растворится, полученную суспензию можно проанализировать на содержание в ней микроорганизмов любым желаемым методом, с разбавлением или без разбавления; саму суспензию можно проанализировать и с помощью прямого микроскопического подсчета.

Можно также поместить мембрану непосредственно на питательную среду. Мембрана растворяется быстро, и микроорганизмы оказываются внедренными в агар. При этом не имеет значения, какая из сторон мембраны обращена вниз, но в любом случае чашка Петри не должна инкубироваться своей верхней стороной вниз, поскольку растворившаяся желатина будет капать на крышку.

По-видимому, желатиновые мембраны можно с успехом применять в самых разнообразных исследованиях содержания микроорганизмов в воздухе, и их следует интенсивнее использовать с целью улучшения санитарного состояния окружающей среды и в различных контрольных процедурах.

14.8. АНАЛИЗ ИНЕРТНЫХ ЧАСТИЦ С ПОМОЩЬЮ МЕМБРАН И ФИЛЬТРОВ

После того как частицы уловлены мембраной или фильтром, необходимо провести определенного рода исследование. Подробное описание аналитических методов в применении к частицам из воздуха можно найти в рекомендациях Амери-

канской ассоциации здравоохранения [2] и Национального института охраны здоровья и лечения профессиональных заболеваний [156, 157]. Этими методами являются следующие.

- Прямая микроскопия частиц на неизменной мембране (см. разд. 8.8 и 8.9).
- Фильтрующий материал можно растворить, а частицы исследовать под микроскопом или подвергнуть химическому анализу. Целлюлозные мембраны, задержавшие неорганические частицы, можно растворить в концентрированной кислоте или сжечь в муфельной печи. При этом процедура растворения не должна влиять на результаты химического анализа или на сами частицы.
- Если фильтрующий материал нерастворим (например, стекловолокно), то его можно разрезать на очень мелкие части и таким образом выделить макрочастицы.
- Представляющие интерес химические компоненты могут быть вымыты с фильтрующего материала соответствующим растворителем и затем проанализированы химическим путем.
- Если исследуемые частицы радиоактивны, то можно непосредственно измерить радиоактивность самого фильтрующего материала.
- При определении общей массы уловленных частиц рабочую мембрану или фильтр следует взвесить параллельно с контрольными, чтобы внести поправку на потерю или увеличение массы.
- Для спектроскопии особенную ценность представляют мембраны Нуклепор благодаря своей полной прозрачности. Таким образом, задержанные этими мембранами частицы можно анализировать, вводя мембраны с исследуемым образцом непосредственно в спектрофотометр.

Фирма «Миллипор» продает специальные анализаторы воздуха, в состав которых входят две наложенные друг на друга мембраны с массами, отличающимися не более чем на 0,1 мг. Через обе мембраны проходит один и тот же поток воздуха, но содержащиеся в воздухе загрязняющие частицы выделяются на верхней (тестовой) мембране, так что любая разница в массах между этими мембранами соответствует массе только загрязняющих частиц. Эти специальные анализаторы содержат мембраны из смешанных эфиров целлюлозы диаметром 37 мм с размером пор 0,8 мкм. Поскольку обе мембраны подобраны таким образом, что разница в их массах составляет менее 0,1 мг, при использовании пробы массой более 1 мг ошибка не превышает 10 %.

Для анализа веществ, уловленных на мембранах при фильтрации воздуха, можно использовать разнообразные

контрольно-измерительные методы, и выбор конкретного метода будет зависеть от самого исследуемого вещества. Чтобы дать некоторое представление о том, как много существует таких методов, мы перечисляем здесь некоторые из них: спектрофотометрия (в инфракрасной, видимой или ультрафиолетовой областях спектра), пламенная фотометрия, эмиссионная спектроскопия, рентгеновская флюоресценция, дифракция рентгеновского излучения, автордиография, активационный анализ, электронная микроскопия, микрохимический анализ, анализ в кольцевой печи. При анализе следов элементов существенно, чтобы используемые фильтрующие материалы содержали минимальное количество посторонних веществ; для таких анализов особенно хорошо подходят некоторые нецеллюлозные полимеры [84, 85]. Результаты некоторых типичных анализов элементов с применением мембранных фильтров были представлены в табл. 4.3 (см. гл. 4).

С помощью метода фильтрации воздуха можно проанализировать широкий диапазон веществ и макрочастиц. Этим методом анализировались следующие вещества: сурьма, мышьяк, свинец, селен, марганец, молибден, кадмий, фториды, уран, цирконий, сера, кремнеземная пыль, дорожная пыль, карбонатная пыль, общая радиоактивность, радиоактивные частицы свинца-210 и стронция-90, плутоний, сульфатные аэрозоли, сернокислотный туман, содержащиеся в пыли разнообразные следы металлов и ароматические углеводороды, бериллий, железо, хром, медь, элементарная ртуть, никель, ванадий, цинк, асбест, нитраты, бензпирены, многоядерные ароматические и алифатические углеводороды.

14.9. ОЧИСТКА ГАЗОВ ФИЛЬТРАЦИЕЙ

Для самых различных лабораторных и промышленных целей требуются газы или воздух, которые должны быть тщательно очищены от макрочастиц. Сжатый лабораторный воздух — наиболее распространенный источник газа для разбавления экспериментальных образцов аэрозолей или для разных операций фильтрации воздуха. Во многих случаях сжатые газы оказываются загрязненными нежелательными примесями, внесенными при их приготовлении, сжатии и хранении. Особенно часто это масляный туман, а также большие количества двуокиси углерода, двуокиси азота, альдегидов, окиси углерода и несгоревших углеводородов. Заметим, что даже воздух 99,9 %-ной чистоты все еще содержит нежелательные примеси в количестве 1000 частиц на миллион.

Для очистки газов от макрочастиц посредством фильтрации можно использовать различные выпускаемые промышлен-

ностью мембраны и фильтры, причем конкретный выбор мембраны или фильтра будет зависеть от размера частиц, которые необходимо удалить, и от корродирующей способности газа. Для удаления частиц размером 5—10 мкм промышленностью выпускаются фильтры из агломерированной бронзы и нержавеющей стали, металлического волокна и вспененного металла. Для удаления частиц размером 2 мкм имеются фильтры из пористого тефлона и другого фторуглерода (Kel-F). Для удаления более мелких частиц лучше всего использовать мембранные фильтры. С помощью мембранных фильтров большого диаметра и соответствующих фильтродержателей, предназначенных для работы под давлением, можно удалять частицы размером до 0,01 мкм. Большинство фирм-изготовителей в документации на мембранные фильтры приводят зависимости давления от скорости потока для своих мембранных фильтров с различным размером пор. Скорость потока обычно дается в л/(мин·см²) фильтрующей поверхности, что позволяет вычислить площадь поверхности мембранного фильтра, необходимую для конкретной цели.

Для фильтрации воздуха в промышленных масштабах ряд фирм-изготовителей выпускает воздушные фильтры в виде патронов. К фирмам, которые специализируются на изготовлении промышленного оборудования для фильтрации воздуха, относятся: «Карборундум корпорейшн», «Болстон», «Пол» и «Фильтерит» (адреса этих фирм представлены в гл. 5). Фирмы «Миллипор» и «Гелман» также выпускают продукцию этого назначения. Фирма «Болстон» производит ряд фильтров, которые можно использовать для удаления из газов масляного тумана. Существуют специальные коалесцирующие фильтры, улавливающие частицы жидкости и заставляющие их сливаться в большие капли, которые постепенно проходят через фильтр и собираются на внешней стороне фильтрующей трубки. После этого образовавшаяся жидкость выдавливается из корпуса фильтра, предназначенного для того, чтобы предотвратить унос этой жидкости с газом, поток которого направляется из фильтра. Поскольку жидкость непрерывно уносится прочь, время службы фильтрующего патрона зависит от того, как много твердых частиц содержится в фильтруемом газе. Когда перепад давления на фильтрующем модуле становится слишком большим, последний нужно обязательно заменить.

14.10. ПОЛУЧЕНИЕ СТЕРИЛЬНОГО ВОЗДУХА

Основное промышленное назначение воздушных фильтров и мембран состоит в получении стерильного воздуха или какого-либо иного газа. Стерилизация воздуха существенно

отличается от стерилизации жидкости (см. гл. 7), поскольку объемы газа, подвергающиеся очистке, очень велики. Пригодность фильтрующего материала для стерилизации может быть оценена измерением его способности задерживать частицы известного размера, например аэрозоль ДОФ (см. разд. 14.6). Если фильтр или мембрана задерживает 99,997 % частиц диаметром 0,3 мкм, то их вполне можно использовать для стерилизации воздуха. Однако желательно также провести испытание с тестовыми бактериальными суспензиями, чтобы убедиться в том, что фильтрующий материал отвечает необходимым требованиям. Для этой цели можно использовать стандартную суспензию спорообразующей бактерии (например, бактерии *Bacillus subtilis*) и метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов с помощью мембранной фильтрации выходящего газа.

Воздушные фильтр-патроны. В большинстве фильтр-патронов, используемых для стерилизации воздуха, фильтрующий материал, представляющий собой волокна из стекла или из какого-либо полимера, наматывается вокруг центрального стержня, причем волокна могут быть скреплены смолой. Для фильтрации воздуха выпускаются также и некоторые мембранные фильтры в виде патронов. Эти мембраны, как правило, гофрированы для увеличения активной поверхности. Фильтр-патроны для мембранной фильтрации воздуха выпускаются фирмой «Гелман» под маркой Акровент и фирмой «Миллипор» под марками Флюоротьюб и Дюрапор. Эти модули содержат мембраны на основе фторуглеродов (как правило, тефлоновые) с порами размером 0,2 мкм. Фирма «Пол» предлагает фильтры из неорганического волокна, скрепленного смолой, которые производятся машиной для получения бумаги. Волокно из титаната калия после обработки силиконом превращается в плотную, похожую на бумагу мембрану с абсолютным размером пор 0,2 мкм; она выпускается в виде гофрированного патрона, который может быть установлен в корпус из нержавеющей стали. Устройство можно многократно стерилизовать паром без разборки, и время его активной службы составляет 4—12 месяцев. Фирма «Пол» поставляет также комплекты тефлоновых фильтр-патронов Эмфлон, которые, возможно, заменят фильтрующий материал на основе титаната калия.

Существует исключительно широкий набор фильтр-патронов промышленного назначения; сведения о них можно получить из каталогов соответствующих фирм (см., в частности, каталоги фирм «Карборундум», «Филтерит», «Болстон»,

«Пол», «Миллипор», «Гелман» и «Сарториус», адреса которых указаны в гл. 5).

Подача стерильного воздуха. подача стерильного воздуха представляет обычную операцию как в лаборатории, так и в промышленности. Стерильные растворы разливаются обычно из герметично закрытых сосудов, а поэтому необходимо принимать определенные меры для замены объема вытекающей жидкости стерильным воздухом. Для этой цели применяют стерильный воздушный клапан. Стерильный воздух используется также во время охлаждающего цикла при обработке растворов в автоклаве. Воздушный клапан содержит, как правило, мембранный фильтр из тефлона с порами размером 0,2 или 0,45 мкм. Тефлоновые мембраны имеют то преимущество, что они гидрофобны, и, следовательно, обладая низкой проницаемостью для воды, пропускают воздух внутрь резервуара взамен той жидкости, которая из этого резервуара вытекает.

Промышленностью выпускаются как дисковые, так и патронные воздушные клапаны, причем выбор того или другого определяется объемом контейнера, в который нужно подвести стерильный воздух. Дисковый клапан может быть смонтирован в конструкции изготовленной из нержавеющей стали или пластмассы шприц-насадки, куда вставляется тефлоновая мембрана.

Фирма «Гелман» продает также специальный воздушный клапан с тефлоновым мембранным фильтром (Акро 50), имеющим размеры пор 0,2, 0,45 и 1,0 мкм. Этот гидрофобный мембранный фильтр диаметром 50 мм помещается в полипропиленовый корпус, и все устройство можно многократно подвергать обработке в автоклаве. Мембрана закреплена между дренажными пластинами, и поток воздуха, следовательно, может пропускаться в любом направлении при давлении до 4 атм. С помощью приспособления, выпускаемого фирмой «Гелман» (рис. 14.12), можно легко проверить клапан Акро 50.

Для подачи стерильного воздуха в большие объемы можно применять фильтр-патроны, содержащие тефлоновые мембраны. Ниже мы приводим фирмы-изготовители таких фильтр-патронов с указанием соответствующих фильтров и значений их площади фильтрующей поверхности:

Фирма «Гелман»	Акровент	0,46 м ²
Фирма «Миллипор»	Аэротьюб	0,12 м ²
Фирма «Миллипор»	Флюорекс	0,09 м ²
Фирма «Пол»	Эмфлон	0,05 — 2,15 м ²

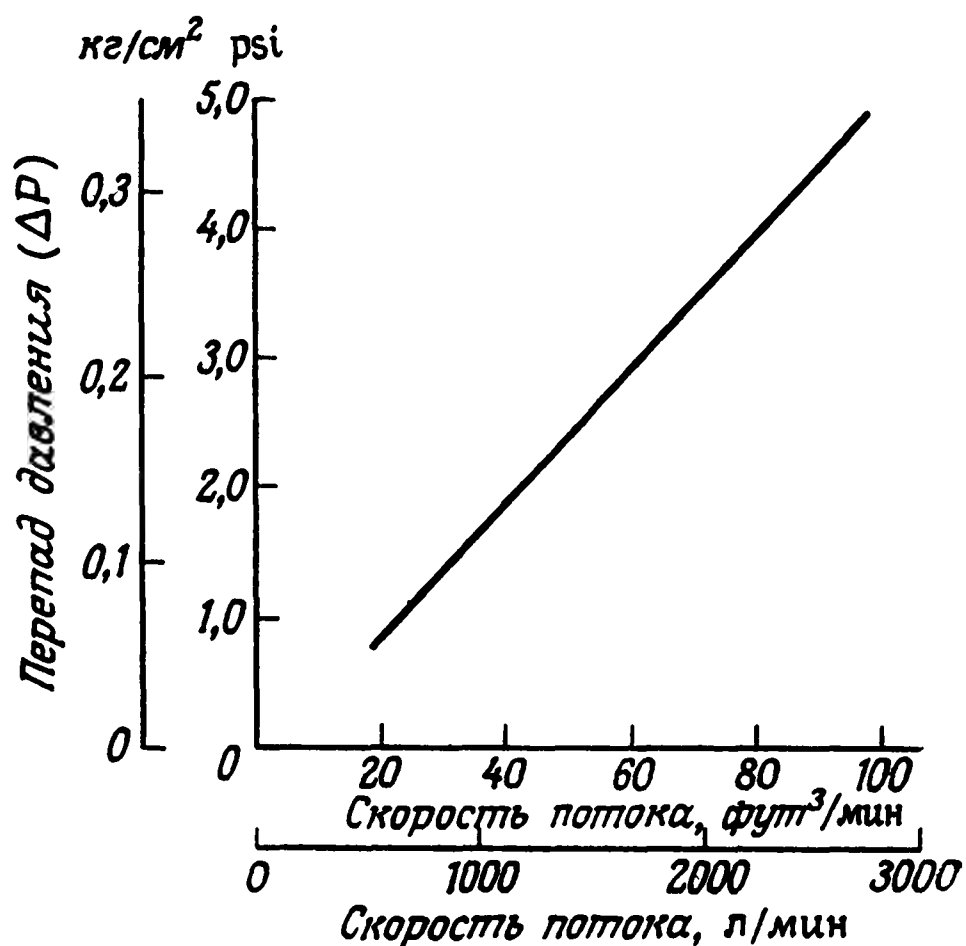


Рис. 14.12. Проверка под давлением целостности мембраны в воздушном клапане Акро 50. (Фото любезно предоставлено научным отделением фирмы «Гелман».)

Чтобы установить размеры системы для подачи стерильного воздуха, необходимо выяснить, какая ожидается скорость потока воздуха. Если воздушный клапан используется для того, чтобы слить жидкость из стерильной емкости, требуемая скорость потока воздуха должна быть такой же, как и скорость истечения жидкости. В большинстве случаев изготовитель в технической документации прилагает график зависимости скорости потока от перепада давления (рис. 14.13). Перепад давления будет функцией высоты столба жидкости и любых потерь на трение в коммуникациях. Вначале этот перепад следует держать минимальным, чтобы компенсировать забивание пор мембраны (его можно увеличить, когда начнется забивание пор). Из графика, представленного соответствующей фирмой, можно определить то необходимое число фильтр-патронов, которое следует использовать. Если необходимо более чем один фильтр-патрон, то можно применить корпус, предназначенный для установки в нем нескольких фильтр-патронов.

В случае подачи стерильного воздуха в автоклав с помощью воздушных клапанных фильтров для вычисления необходимой площади фильтрующей поверхности можно вос-

Рис. 14.13. График зависимости скорости потока от перепада давления для отдельного воздушного фильтр-патрона Акровент фирмы «Гелман». (По материалам научного отделения фирмы «Гелман сайенсиз».)



пользоваться следующей формулой (любезно предоставленной нам специалистами фирмы «Гелман»):

$$S = \frac{5V_a}{14,7Ct},$$

где S — требуемая площадь фильтрующей поверхности мембраны (в см^2), V_a — объем автоклава (в литрах), t — время, необходимое для выравнивания вакуума (в минутах), и C — константа, определяемая типом мембраны и размером пор. Для тефлоновой мембраны с порами 0,2 мкм мы имеем $C=0,25$.

Олсон и др. [162] описали простой тест для оценки эффективности стерильных воздушных клапанов с мембранами. Двадцатилитровые бутылки частично заполняются стерильным триптиказно-соевым бульоном и оборудуются соответствующими впускными и выпускными шлангами. Шланг, идущий от проверяемого воздушного клапана, помещается над бульоном таким образом, чтобы его конец находился на расстоянии 3 см от поверхности бульона. Воздух, проходящий через клапан, будет, таким образом, попадать на поверхность бульона. Если воздушный клапан с мембранным фильтром является исправным, то бульон будет сохраняться стерильным на протяжении многих суток; если же мембрана повреждена, то в течение двух суток бульон помутнеет. Этот тест прост и исключает необходимость в более сложных тестах с бактериальными аэрозолями.

В течение многих лет практиковалась стерилизация воздуха в ферментерах с помощью глубинных фильтров. Поэтому

имеет смысл перечислить несколько существенных преимуществ мембранных фильтров по сравнению с глубинными.

- Для мембранных фильтров характерна абсолютная задержка частиц с размерами, большими, чем расчетный размер пор, в то время как глубинные фильтры обладают лишь номинальной задержкой.

- Эффективность задержки мембранными фильтрами не зависит от перепада давления и скорости потока.

- Мембранные фильтры не подвержены действию пневмодара, тогда как при использовании глубинных фильтров частицы, расположенные внизу, под действием пневматического удара могут быть вытеснены в ферментер.

- Материал мембранных фильтров, как правило, не отслаивается и не загрязняет ферментер частицами волокна, как это бывает с глубинными фильтрами.

- На работу мембранных фильтров не влияет сырость, в то время как эффективность глубинных фильтров резко снижается под действием влаги.

- Структура мембранных фильтров исключает эффект канализации, в то время как глубинные фильтры его обнаруживают, что приводит к пропусканию частиц и микроорганизмов через глубинный фильтр.

Вычисление площади суммарной поверхности фильтр-патронов, используемых для фильтрации воздуха, поступающего в ферментер, оказывается несколько более сложной задачей, чем аналогичная задача в случае подачи стерильного воздуха в автоклав, рассмотренная выше. Ниже мы приводим расчет, заимствованный из информационных материалов, которыми фирма «Гелман» снабжает своих специалистов¹. В первую очередь необходимо знать скорость поступающего потока воздуха в кубических футах в минуту (G , фут³/мин). Поскольку скорость газового потока часто дается в стандартных (т. е. приведенных к стандартному давлению, равному 1 атм или 14,7 psi) кубических футах в минуту [G^* , фут³/(мин·psi)], ее нужно сначала пересчитать в единицах фут³/мин по формуле

$$G = \frac{14,7}{P + 14,7} G^*,$$

где P — давление газа, измеренное в фунт-силах на 1 квадратный дюйм (psig).

¹ Расчеты, подобные приведенным ниже, обычно представлены в каталогах и других иностранных фирм. Поэтому формулы и размерности величин, которые в эти формулы входят, здесь даны, как в оригинале. 1 psi = 6,9 кН/м² ≈ 0,068 атм; 1 фут = 0,3048 м. — Прим. ред.

Зная скорость потока в фут³/мин, на графике (рис. 14.13) нужно найти для данного фильтр-патрона соответствующий этой скорости перепад давления. Затем необходимо определить рабочее давление в ферментере; оно будет равно давлению на выходе из фильтр-патрона. Зная давление на выходе и перепад давления, найденный из графика на рис. 14.13, можно ориентировочно оценить требования, предъявляемые к фильтрующему модулю. Однако, поскольку давление за мембраной упало, скорость потока G возросла. Так как это изменение скорости потока произошло на мембране, расчетная скорость потока будет равна

$$G_{\text{расч}} = \frac{G_{\text{вх}} + G_{\text{вых}}}{2}.$$

В качестве примера рассмотрим следующие вычисления:

$$P_{\text{вх}} = 30 \text{ psig},$$

$$G^* = 1500 \text{ фут}^3/(\text{мин} \cdot \text{psi}).$$

Минимально необходимое давление на выходе: $P_{\text{вых}} = 12 \text{ psig}$.

$$G_{\text{вх}} = 1500 \frac{14,7}{30 + 14,7} = 493,3 \text{ фут}^3/\text{мин}.$$

Если начальный перепад давления был равен 5 psi, то из графика на рис. 14.13 можно определить, что скорость потока через один фильтр-патрон типа Акровент будет равна 95 фут³/мин, и, следовательно, нужно применить 6 таких фильтр-патронов (в действительности 5,2). Продолжив вычисления, получим давление на выходе:

$$P_{\text{вых}} = 30 \text{ psi} - 5 \text{ psi} = 25 \text{ psi}$$

и скорость потока на выходе

$$G_{\text{вых}} = 1500 \frac{14,7}{25 + 14,7} = 555 \text{ фут}^3/\text{мин}.$$

Таким образом, расчетная скорость потока равна

$$G_{\text{расч}} = \frac{493,3 + 555}{2} \approx 524 \text{ фут}^3/\text{мин}.$$

Эта вычисленная скорость потока может регулироваться с помощью шести фильтр-патронов при разности давления несколько выше, чем 5 psi. Рассмотренный выше расчет можно модифицировать применительно к любой конкретной ситуации. Было бы весьма желательно, чтобы перед окончательной установкой оборудования потребитель обсудил этот вопрос с представителем фирмы-изготовителя.

14.11. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель этой главы состояла в том, чтобы продемонстрировать применение мембранных и глубинных фильтров как для анализа загрязнения воздуха, так и для фильтрации воздуха в целом. Это чрезвычайно сложный вопрос, и мы затронули его лишь в самых общих чертах. Благодаря большому значению анализа распределения частиц по размерам для исследования загрязнения воздуха, особенно применительно к области профессиональных заболеваний, мембранные фильтры играют огромную роль для контроля и регламентации ряда факторов риска, связанных со здоровьем сотрудников, непосредственно на рабочих местах.

Существенно то, что извлечение макрочастиц из воздуха с помощью мембранной фильтрации представляет собой процесс более сложный, нежели извлечение частиц из жидкости. В случае жидкости извлечение частиц происходит почти полностью путем механической задержки, в то время как из газов частицы извлекаются также при соударениях и диффузии.

Для анализа частиц, находящихся в воздухе, мембранные фильтры обладают рядом существенных преимуществ. Задержанные частицы остаются на поверхности мембраны, где их можно легко анализировать микроскопически или с помощью химических методов. До того как были разработаны мембранные фильтры, микроскопический анализ частиц по размерам был более трудоемким. Особенно хорошо для анализа частиц в воздухе подходят мембраны Нуклепор. Они ведут себя как истинные сита и могут быть классифицированы по калибрам в виде отдельных комплектов, каждый из которых предназначен для задержки частиц конкретного размера. Благодаря своей малой массе, а также потому, что они практически не набухают в воде, мембраны Нуклепор могут с успехом применяться в гравиметрическом анализе, что позволяет определять распределение частиц в атмосфере по массе.

Приложение

Технические характеристики мембран, выпускаемых разными фирмами-изготовителями

В настоящей книге мы непрерывно встречались со ссылками на специфическую продукцию различных фирм. Цель данного приложения состоит в том, чтобы в удобном и сжатом виде представить перечень технических характеристик мембранных фильтров в соответствии с каталогами некоторых фирм-изготовителей, предлагающих эти мембранные фильтры в широком ассортименте. Из-за недостатка места невозможно было перечислить всех изготовителей, и мы выбрали лишь те фирмы, продукция которых вполне доступна и имеет большое разнообразие. Мы здесь воспроизводим главным образом данные, указанные в каталогах фирм-изготовителей. Если не считать некоторых перестановок столбцов в таблице, текст не был ни перепечатан, ни изменен. Фирмы «Гелман сайенсиз» и «Миллипор корпорейшн» представили нам фотокопии, а каталоги фирмы «Сарториус» мы скопировали сами. Лишь материалы фирмы «Нуклепор» пришлось набирать заново. Конечно, хотелось бы привести больше данных, но, к сожалению, такие ведущие фирмы, как «Шляйхер и Шуль» или «МФС», не выпускают компактных каталогов с техническими характеристиками своих мембран, а переделывать эти каталоги на более удобный формат было бы слишком дорого и трудоемко.

Мы не приводим данных о дополнительном оборудовании, таком, как специальные фильтродержатели, патроны или нефилтрующие материалы. Задача заключается лишь в том, чтобы дать потребителю сведения о мембранных фильтрах, о том, какие они имеют характеристики, а именно размер пор, диаметр, цвет, тип фильтра. Следует подчеркнуть также, что фирмы-изготовители продолжают видоизменять и совершенствовать свою продукцию, а приводимые нами здесь сведения отвечают состоянию дел в этой области на начало 1983 г.

Таблица П. 1. Мембраны фирмы «Гелман сайенсиз»

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Мембраны без подложки						
Мембраны Метрисел						
Метрисел GA, триацетат						
60298	GA-8	0,2	13	Гладкие	100	
60300	GA-8	0,2	25	»	100	
60301	GA-8	0,2	47	»	100	
5006	GA-8	0,2	47	»	100	Стерилизованы в автоклаве
63025	GA-8	0,2	47	»	100	Стерилизованы
50334	GA-8	0,2	90	»	100	
60305	GA-8	0,2	142	»	25	
60307	GA-8	0,2	293	»	25	
60234	GA-7	0,3	13	»	100	
60236	GA-7	0,3	25	»	100	
60237	GA-7	0,3	47	»	100	
60270	GA-7	0,3	90	»	100	
60241	GA-7	0,3	142	»	25	
60243	GA-7	0,3	293	»	25	
60170	GA-6	0,45	13	»	100	
61851	GA-6	0,45	13	С сеткой	100	
60172	GA-6	0,45	25	Гладкие	100	
61852	GA-6	0,45	25	С сеткой	100	
60173	GA-6	0,45	47	Гладкие	100	
5011	GA-6	0,45	47	С сеткой	100	Стерилизованы
5004	GA-6	0,45	47	С сеткой	100	Стерилизованы в автоклаве
61854	GA-6	0,45	47	С сеткой	100	
60174	GA-6	0,45	50	Гладкие	100	
60206	GA-6	0,45	90	»	100	
60175	GA-6	0,45	102	»	100	
60177	GA-6	0,45	142	»	25	
60179	GA-6	0,45	293	»	25	
66103	GA-6	0,45	50	С сеткой	1000	Индивидуально стерилизованы
61844	GA-4	0,8	13	С сеткой	100	
60107	GA-4	0,8	13	Гладкие	100	
61845	GA-4	0,8	25	С сеткой	100	
60109	GA-4	0,8	25	Гладкие	100	
5003	GA-4	0,8	47	С сеткой	100	Стерилизованы в автоклаве
60110	GA-4	0,8	47	Гладкие	100	
61846	GA-4	0,8	47	С сеткой	100	
5010	GA-4	0,8	47	»	100	Стерилизованы
64525	GA-4	0,8	90	Гладкие	100	
60114	GA-4	0,8	142	»	25	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
60116	GA-4	0,8	293	Гладкие	25	
60044	GA-3	1,2	13	»	100	
60046	GA-3	1,2	25	»	100	
60047	GA-3	1,2	47	»	100	
60080	GA-3	1,2	90	»	100	
60053	GA-3	1,2	293	»	25	
60000	GA-1	5	13	»	100	
60002	GA-1	5	25	»	100	
60003	GA-1	5	47	»	100	
64524	GA-1	5	90	»	100	

Метрисел Альфа

60582	Alpha-200	0,2	13	Гладкие	100	
60584	Alpha-200	0,2	25	»	100	
60585	Alpha-200	0,2	47	»	100	
60615	Alpha-200	0,2	90	»	100	
60589	Alpha-200	0,2	142	»	25	
62057	Alpha-200	0,2	293	»	25	
60537	Alpha-450	0,45	13	»	100	
60539	Alpha-450	0,45	25	»	100	
60540	Alpha-450	0,45	47	»	100	
60570	Alpha-450	0,45	90	»	100	
60544	Alpha-450	0,45	142	»	25	
62042	Alpha-450	0,45	293	»	25	

Метрисел TCM

64810	TCM-200	0,2	13	Гладкие	100	
64812	TCM-200	0,2	25	»	100	
64814	TCM-200	0,2	47	»	100	
64858	TCM-200	0,2	90	»	100	
64819	TCM-200	0,2	142	»	25	
64822	TCM-200	0,2	293	»	25	
64826	TCM-450	0,45	13	»	100	
64828	TCM-450	0,45	25	»	100	
64830	TCM-450	0,45	47	»	100	
64859	TCM-450	0,45	90	»	100	
64835	TCM-450	0,45	142	»	25	
64838	TCM-450	0,45	293	»	25	

Метрисел GN

64193	GN-6	0,45	13	С сеткой	100	
63066	GN-6	0,45	13	Гладкие	100	
64191	GN-6	0,45	25	С сеткой	100	
63068	GN-6	0,45	25	Гладкие	100	
60511	GN-6	0,45	25	Гладкие, черные	100	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
62136	GN-6	0,45	25	С сеткой, черные	100	
64375	GN-6	0,45	37	С сеткой	100	
64382	GN-6	0,45	37	Гладкие	100	
64141	GN-6	0,45	37	Гладкие, черные	100	
64142	GN-6	0,45	37	С сеткой, черные	100	
63020	GN-6	0,45	47	С сеткой	100	
63077	GN-6	0,45	47	С сеткой	100	Стерилизованы
63069	GN-6	0,45	47	Гладкие	100	
66068	GN-6	0,45	47	С сеткой	1000	Предварительно индивидуально стерилизованы
66378	GN-6	0,45	47	С сеткой, черные	200	Предварительно индивидуально стерилизованы
64194	GN-6	0,45	47	С сеткой	100	Стерилизованы в автоклаве
60512	GN-6	0,45	47	Гладкие, черные	100	
62015	GN-6	0,45	47	С сеткой, черные	100	
66379	GN-6	0,45	47	С сеткой, зеленые	200	Предварительно индивидуально стерилизованы
66420	GN-6	0,45	50	С сеткой, зеленые	200	Индивидуально стерилизованы
64535	GN-6	0,45	90	Гладкие	100	
63072	GN-6	0,45	102	Гладкие	100	
66421	GN-6	0,45	50	С сеткой, черные	200	Индивидуально стерилизованы
64677	GN-4	0,8	25	Гладкие	100	
66177	GN-4	0,8	25	С сеткой	100	
61895	GN-4	0,8	25	С сеткой, черные	100	
64678	GN-4	0,8	37	Гладкие	100	
66178	GN-4	0,8	37	С сеткой	100	
64679	GN-4	0,8	47	Гладкие	100	
66179	GN-4	0,8	47	С сеткой	100	
66376	GN-4	0,8	47	С сеткой, черные	200	Предварительно индивидуально стерилизованы
66377	GN-4	0,8	47	С сеткой, зеленые	200	Предварительно индивидуально стерилизованы
64747	Несущая подложка		37	Целлюлозные	500	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Метрисел GN с гидрофобными краями (6 мм)						
66123	GN-6	0,45	47	С сеткой	100	
66128	GN-6	0,45	47	Гладкие	100	
Метрисел DM						
64512	DM-450	0,45	13	Гладкие	100	
64514	DM-450	0,45	25	»	100	
64616	DM-450	0,45	37	»	100	
64515	DM-450	0,45	47	»	100	
64943	DM-450	0,45	90	»	100	
64517	DM-450	0,45	102	»	100	
64499	DM-800	0,8	13	»	100	
64501	DM-800	0,8	25	»	100	
64530	DM-800	0,8	37	»	100	
64502	DM-800	0,8	47	»	100	
66059	DM-800	0,8	90	»	100	
64505	DM-800	0,8	102	»	100	
Метрисел Винил						
60690	VM-1	5	13	Гладкие	100	
60692	VM-1	5	25	»	100	
60714	VM-1	5	37	»	100	
60693	VM-1	5	47	»	100	
60726	VM-1	5	90	»	100	
60695	VM-1	5	102	»	100	
Таффрин НТ						
66185	НТ-100	0,1	25	Гладкие	100	
66187	НТ-100	0,1	47	»	100	
66189	НТ-100	0,1	90	»	100	
66192	НТ-100	0,1	142	»	25	
66193	НТ-100	0,1	293	»	25	
66195	НТ-200	0,2	13	»	100	
66197	НТ-200	0,2	25	»	100	
66199	НТ-200	0,2	47	»	100	
66201	НТ-200	0,2	90	»	100	
66204	НТ-200	0,2	142	»	25	
66205	НТ-200	0,2	293	»	25	
66219	НТ-450	0,45	13	»	100	
66221	НТ-450	0,45	25	»	100	
66223	НТ-450	0,45	47	»	100	
66225	НТ-450	0,45	90	»	100	
66228	НТ-450	0,45	142	»	25	
66229	НТ-450	0,45	293	»	25	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Мембранные фильтры с подложкой						
Версапор						
66385	Versapor3000	3,0	13		100	
66386	Versapor3000	3,0	25		100	
66387	Versapor3000	3,0	47		100	
66388	Versapor3000	3,0	90		100	
66389	Versapor3000	3,0	142		25	
66390	Versapor3000	3,0	293		25	
66300	Versapor3000	3,0	254×4267		Испытательный рулон	
66392	Versapor1200	1,2	13		100	
66393	Versapor1200	1,2	25		100	
66394	Versapor1200	1,2	47		100	
66395	Versapor1200	1,2	90		100	
66396	Versapor1200	1,2	142		25	
66397	Versapor1200	1,2	293		25	
66298	Versapor1200	1,2	254×4267		Испытательный рулон	
66399	Versapor800	0,8	13		100	
66400	Versapor800	0,8	25		100	
66401	Versapor800	0,8	47		100	
66402	Versapor800	0,8	90		100	
66403	Versapor800	0,8	142		25	
66404	Versapor800	0,8	293		25	
66365	Versapor800	0,8	254×4267		Испытательный рулон	
66406	Versapor450	0,45	13		100	
66407	Versapor450	0,45	25		100	
66408	Versapor450	0,45	47		100	
66409	Versapor450	0,45	90		100	
66410	Versapor450	0,45	142		25	
66411	Versapor450	0,45	293		25	
66363	Versapor450	0,45	254×4267		Испытательный рулон	
66413	Versapor200	0,2	13		100	
66414	Versapor200	0,2	25		100	
66415	Versapor200	0,2	47		100	
66416	Versapor200	0,2	90		100	
66417	Versapor200	0,2	142		25	
66418	Versapor200	0,2	293		25	
66362	Versapor200	0,2	254×4267		Испытательный рулон	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Тефлон TF						
66141	TF-200	0,2	13	Гладкие	100	
66142	TF-200	0,2	25	»	100	
66143	TF-200	0,2	47	»	100	
66144	TF-200	0,2	90	»	100	
66145	TF-200	0,2	142	»	25	
66146	TF-200	0,2	293	»	25	
66147	TF-450	0,45	13	»	100	
66148	TF-450	0,45	25	»	100	
66149	TF-450	0,45	47	»	100	
66150	TF-450	0,45	90	»	100	
66151	TF-450	0,45	142	»	25	
66152	TF-450	0,45	293	»	25	
66153	TF-1000	1	13	»	100	
66154	TF-1000	1	25	»	100	
66155	TF-1000	1	47	»	100	
66156	TF-1000	1	90	»	100	
66157	TF-1000	1	142	»	25	
66158	TF-1000	1	293	»	25	

Предфильтры**Полипропилен**

61754	Polypropylene	10	13		500	
61756	»	10	25		500	
61757	»	10	47		100	
61789	»	10	76		100	
61790	»	10	90		100	
61795	»	10	127		100	
61720	»	10	42		100	
61801	»	10	257		100	
61761	»	10	265		100	
61753	»	10	293		100	

Стекловолоконные фильтры**Гласс Фибер Филтерс А**

61715	А	1	37		500	
61694	А	1	47		100	
61696	А	1	102		100	
61701	А	1	203×254		100	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер пор, мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Гласс Фибер Филтерс А/Е						
61628	А/Е	1	13		500	
61629	А/Е	1	20		500	
61630	А/Е	1	25		500	
61652	А/Е	1	37		500	
61631	А/Е	1	47		100	
61632	А/Е	1	50		100	
61663	А/Е	1	76		100	
61664	А/Е	1	90		100	
61633	А/Е	1	102		100	
61669	А/Е	1	127		100	
61635	А/Е	1	142		100	
61675	А/Е	1	257		100	
61636	А/Е	1	265		100	
61637	А/Е	1	293		100	
61638	А/Е	1	203×254		100	
Гласс Фибер Филтерс Extra Thick						
66073	Extra Thick	1	13		100	
66075	»	1	25		100	
66077	»	1	45		1000	
66078	»	1	47		100	
66080	»	1	76		100	
66081	»	1	90		100	
66084	»	1	127		50	
66085	»	1	142		50	
66086	»	1	257		25	
66087	»	1	265		25	
66088	»	1	293		25	
Метригард						
64794	Metrigard	0,7	13		100	
64795	»	0,7	20		100	
64796	»	0,7	25		100	
64798	»	0,7	47		100	
64890	»	0,7	90		100	
64802	»	0,7	127		100	
64803	»	0,7	142		100	
64805	»	0,7	265		25	
64807	»	0,7	293		25	
Микро Кварц						
66096	Glass Fiber	1	25		100	
66097	»	1	37		100	
66098	»	1	47		100	
66099	»	1	102		100	
66100	»	1	203×254		25	

(Продолжение табл. П.1)

Номер по каталогу	Тип	Размер по мкм	Диаметр или линейные размеры, мм	Описание	К-во в упаковке, шт.	Примеч.
Спектро Грейд						
64876	Glass Fiber	N/A	25		100	
64877	»	N/A	37		100	
64878	»	N/A	47		100	
64879	»	N/A	50		100	
64881	»	N/A	102		100	
64884	»	N/A	142		100	
64948	»	N/A	203× 254		100	

Таблица П.2. Мембраны фирмы «Миллипор корпорейшн»

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу
Дисковые мембраны Дюрапор					
Гидрофобные					
0,22	13	Белый	Гладкие	100	GVHP 013 00
0,22	25	»	»	100	GVHP 025 00
0,22	47	»	»	100	GVHP 047 00
0,22	90	»	»	50	GVHP 090 50
0,22	142	»	»	50	GVHP 142 50
0,22	293	»	»	25	GVHP 293 25
0,45	13	Белый	Гладкие	100	HVHP 013 00
0,45	25	»	»	100	HVHP 025 00
0,45	47	»	»	100	HVHP 047 00
0,45	90	»	»	50	HVHP 090 50
0,45	142	»	»	50	HVHP 142 50
0,45	293	»	»	25	HVHP 293 25
Гидрофобные, складчатой конфигурации					
0,22	293	Белый	Гладкие	25	GVHP 293 MP
0,45	293	»	»	25	HVHP 293 MP
Гидрофильные					
0,22	13	Желтоватый	Гладкие	100	GVWP 013 00
0,22	25	»	»	100	GVWP 025 00
0,22	47	»	»	100	GVWP 047 00
0,22	90	»	»	50	GVWP 090 50
0,22	142	»	»	50	GVWP 142 50
0,22	293	»	»	25	GVWP 293 25
0,45	13	»	»	100	HVLP 013 00
0,45	25	»	»	100	HVLP 025 00
0,45	47	»	»	100	HVLP 047 00
0,45	90	»	»	50	HVLP 090 50
0,45	142	»	»	50	HVLP 142 50
0,45	293	»	»	25	HVLP 293 25
Гидрофильные, складчатой конфигурации					
0,22	293	Желтоватый	Гладкие	25	GVWP 293 MP
0,45	293	»	»	25	HVLP 293 MP
Мембраны Миллипор MF					
8,0	13	Белый	Гладкие	100	SCWP 013 00
8,0	24	»	»	100	SCWP 024 00
8,0	25	»	»	100	SCWP 025 00
8,0	47	»	»	100	SCWP 047 00
8,0	90	»	»	100	SCWP 090 00
8,0	90	»	»	25	SCWP 090 25
8,0	142	Белый	Гладкие	10	SCWP 142 00
8,0	142	»	»	50	SCWP 142 50
8,0	293	»	»	5	SCWP 293 00
8,0	293	»	»	25	SCWP 293 25
5,0	13	»	»	100	SMWP 013 00
5,0	24	»	»	100	SMWP 024 00
5,0	25	»	»	100	SMWP 025 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу
5,0	47	Белый	Гладкие	100	SMWP 047 00
5,0	90	»	»	100	SMWP 090 00
5,0	90	»	»	25	SMWP 090 25
5,0	142	»	»	10	SMWP 142 00
5,0	142	»	»	50	SMWP 142 50
5,0	293	»	»	5	SMWP 293 00
5,0	293	»	»	25	SMWP 293 25
3,0	13	Белый	Гладкие	100	SSWP 013 00
3,0	24	»	»	100	SSWP 024 00
3,0	25	»	»	100	SSWP 025 00
3,0	47	»	»	100	SSWP 047 00
3,0	90	»	»	100	SSWP 090 00
3,0	90	»	»	25	SSWP 090 25
3,0	142	»	»	10	SSWP 142 00
3,0	142	»	»	50	SSWP 142 50
3,0	293	»	»	5	SSWP 293 00
3,0	293	»	»	25	SSWP 293 25
1,2	13	Белый	Гладкие	100	RAWP 013 00
1,2	13	»	С сеткой	100	RAWG 013 00
1,2	24	»	Гладкие	100	RAWP 024 00
1,2	24	»	С сеткой	100	RAWG 024 00
1,2	25	»	Гладкие	100	RAWP 025 00
1,2	25	»	С сеткой	100	RAWG 025 00
1,2	47	»	Гладкие	100	RAWP 047 00
1,2	47	»	С сеткой	100	RAWG 047 00
1,2	90	»	Гладкие	100	RAWP 090 00
1,2	90	»	»	25	RAWP 090 25
1,2	142	»	»	10	RAWP 142 00
1,2	142	»	»	50	RAWP 142 50
1,2	293	»	»	5	RAWP 293 00
1,2	293	»	»	25	RAWP 293 25
0,8	13	Белый	Гладкие	100	AAWP 013 00
0,8	13	»	С сеткой	100	AAWG 013 00
0,8	13	Черный	Гладкие	100	AABP 013 00
0,8	13	Черный	С сеткой	100	AABG 013 00
0,8	24	Белый	Гладкие	100	AAWP 024 00
0,8	24	»	С сеткой	100	AAWG 024 00
0,8	25	»	Гладкие	100	AAWP 025 00
0,8	25	»	С сеткой	100	AAWG 025 00
0,8	25	Черный	Гладкие	100	AABP 025 00
0,8	25	»	С сеткой	100	AABG 025 00
0,8	47	Белый	Гладкие	100	AAWP 047 00
0,8	47	»	С сеткой	100	AAWG 047 00
0,8	47	Черный	Гладкие	100	AABP 047 00
0,8	47	»	С сеткой	100	AABC 047 00
0,8	90	Белый	Гладкие	100	AAWP 090 00
0,8	90	»	»	25	AAWP 090 25
0,8	142	»	»	10	AAWP 142 00
0,8	142	»	»	50	AAWP 142 50
0,8	293	»	»	5	AAWP 293 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,8	293	Белый	Гладкие	25	AAWP	293 25
0,8	203×254	»	»	10	AAWP	810 10
0,8	203×254	»	»	100	AAWP	810 00
0,65	13	»	»	100	DAWP	013 00
0,65	13	»	С сеткой	100	DAWG	013 00
0,65	25	»	Гладкие	100	DAWP	025 00
0,65	25	»	С сеткой	100	DAWG	025 00
0,65	47	»	Гладкие	100	DAWP	047 00
0,65	47	»	С сеткой	100	DAWG	047 00
0,65	90	»	Гладкие	100	DAWP	090 00
0,65	90	»	»	25	DAWP	090 25
0,65	142	»	»	10	DAWP	142 00
0,65	142	»	»	50	DAWP	142 50
0,65	293	»	»	5	DAWP	293 00
0,65	293	»	»	25	DAWP	293 25
0,45	13	»	Гладкие	100	HAWP	013 00
0,45	13	»	С сеткой	100	HAWG	013 00
0,45	13	Черный	Гладкие	100	HABP	013 00
0,45	13	»	С сеткой	100	HABG	013 00
0,45	24	Белый	Гладкие	120	HAMK	024 12
0,45	24	»	»	100	HAWP	024 00
0,45	24	»	»	120	HAWP	024 12
0,45	24	»	С сеткой	100	HAWG	024 00
0,45	25	»	Гладкие	100	HAWP	025 00
0,45	25	»	С сеткой	100	HAWG	025 00
0,45	25	Черный	Гладкие	100	HABP	025 00
0,45	25	»	С сеткой	100	HABG	025 00
0,45	47	Белый	Гладкие	100	HAWP	047 00
0,45	47	»	С сеткой	100	HAWG	047 00
0,45	47	Черный	Гладкие	100	HABP	047 00
0,45	47	»	С сеткой	100	HABG	047 00
0,45	90	Белый	Гладкие	100	HAWP	090 00
0,45	90	»	»	25	HAWP	090 25
0,45	142	»	»	10	HAWP	142 00
0,45	142	»	»	50	HAWP	142 50
0,45	293	»	»	5	HAWP	293 00
0,45	293	»	»	25	HAWP	293 25
0,45	203×254	»	»	10	HAWP	810 10
0,45	203×254	»	»	100	HAWP	810 00
0,30	13	»	Гладкие	100	PHWP	013 00
0,30	24	»	»	100	PHWP	024 00
0,30	25	»	»	100	PHWP	025 00
0,30	47	»	»	100	PHWP	047 00
0,30	90	»	»	100	PHWP	090 00
0,30	90	»	»	25	PHWP	090 25
0,30	142	»	»	10	PHWP	142 00
0,30	142	»	»	50	PHWP	142 50
0,30	293	»	»	5	PHWP	293 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,30	293	Белый	Гладкие	25	PHWP	293 25
0,22	13	»	»	100	GSWP	013 00
0,22	24	»	»	100	GSWP	024 00
0,22	25	»	»	100	GSWP	025 00
0,22	47	»	»	100	GSWP	047 00
0,22	90	»	»	100	GSWP	090 00
0,22	90	»	»	25	GSWP	090 25
0,22	142	»	»	10	GSWP	142 00
0,22	142	»	»	50	GSWP	142 50
0,22	293	»	»	5	GSWP	293 00
0,22	293	»	»	25	GSWP	293 25
0,10	13	»	»	100	VCWP	013 00
0,10	24	»	»	100	VCWP	024 00
0,10	25	»	»	100	VCWP	025 00
0,10	47	»	»	100	VCWP	047 00
0,10	90	»	»	100	VCWP	090 00
0,10	90	»	»	25	VCWP	090 25
0,10	142	»	»	10	VCWP	142 00
0,10	142	»	»	50	VCWP	142 50
0,10	293	»	»	5	VCWP	293 00
0,10	293	»	»	25	VCWP	293 25
0,05	13	»	»	100	VMWP	013 00
0,05	24	»	»	100	VMWP	024 00
0,05	25	»	»	100	VMWP	025 00
0,05	47	»	»	100	VMWP	047 00
0,05	90	»	»	25	VMWP	090 25
0,05	142	»	»	10	VMWP	142 00
0,05	142	»	»	50	VMWP	142 50
0,05	293	»	»	5	VMWP	293 00
0,05	293	»	»	25	VMWP	293 25
0,025	13	»	»	100	VSWP	013 00
0,025	24	»	»	100	VSWP	024 00
0,025	25	»	»	100	VSWP	025 00
0,025	47	»	»	100	VSWP	047 00
0,025	90	»	»	100	VSWP	090 00
0,025	90	»	»	25	VSWP	090 25
0,025	142	»	»	10	VSWP	142 00
0,025	142	»	»	50	VSWP	142 50
0,025	293	»	»	5	VSWP	293 00
0,025	293	»	»	25	VSWP	293 25
Складчатой конфигурации						
5,0	293	Белый	Гладкие	100	SMMP	293 00
3,0	293	»	»	20	SSMP	293 20
1,2	293	»	»	100	RAMP	293 00
1,2	293	»	»	20	RAMP	293 20
0,8	293	»	»	100	AAMP	293 00
0,8	293	»	»	20	AAMP	293 20
0,65	293	»	»	100	DAMP	293 00
0,65	293	»	»	20	DAMP	293 20

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор., мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,45	293	Белый	Гладкие	100	HAMP	293 00
0,45	293	»	»	20	HAMP	293 20
0,12	293	»	»	100	GSMP	293 00
0,22	293	»	»	20	GSMP	293 20
Для заправки мониторов, с тонкими абсорбирующими подложками						
8,0	37	Белый	Гладкие	100	SCWP	037 00
5,0	37	»	»	100	SMWP	037 00
3,0	37	»	»	100	SSWP	037 00
1,2	37	»	»	100	RAWP	037 00
0,8	37	»	»	100	AAWP	037 00
0,8	37	»	С сеткой	100	AAWG	037 00
0,8	37	Черный	То же	100	AABG	037 00
0,45	37	Белый	Гладкие	100	HAWP	037 00
0,45	37	»	С сеткой	100	HAWG	037 00
0,45	37	Черный	С сеткой	100	HABG	037 00
0,22	37	Белый	Гладкие	100	GSWP	037 00
Для заправки мониторов, с толстыми абсорбирующими подложками						
5,0	37	Белый	Гладкие	100	SMWP	037 PO
0,8	37	»	»	100	AAWP	037 PO
0,8	37	»	С сеткой	100	AAWG	037 PO
0,45	37	»	То же	100	HAWG	037 PO
0,45	37	»	Гладкие	100	HAWP	037 PO
Для заправки мониторов, взвешенные попарно, с толстыми абсорбирующими подложками						
0,8	37	Белый	Гладкие	50 пар	AAWP	037 PM
Упакованные для автоклавирования, с абсорбирующими подложками						
1,2	47	Белый	Гладкие	100	RAWP	047 AO
0,8	47	»	»	100	AAWP	047 AO
0,8	47	»	С сеткой	100	AAWG	047 AO
0,65	47	»	Гладкие	100	DAWP	047 AO
0,65	47	»	С сеткой	100	DAWG	047 AO
0,45	47	»	Гладкие	100	HAWP	047 AO
0,45	47	»	С сеткой	100	HAWG	047 AO
0,22	47	»	Гладкие	100	GSWP	047 AO
Стерильно упакованные, с абсорбирующими подложками						
0,8	47	Белый	Гладкие	100	AAWP	047 SO
0,8	47	»	С сеткой	100	AAWG	047 SO
0,8	47	Черный	Гладкие	100	AABP	047 SO
0,8	47	»	С сеткой	100	AABG	047 SO
0,65	47	Белый	Гладкие	100	DAWP	047 SO
0,65	47	»	С сеткой	100	DAWG	047 SO
0,45	47	»	Гладкие	100	HAWP	047 SO
0,45	47	»	С сеткой	100	HAWG	047 SO

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,45	47	Черный	Гладкие	100	HABP	047 SO
0,45	47	»	С сеткой	100	HABG	047 SO
0,22	47	Белый	Гладкие	100	GSWP	047 SO
S-Рак, стерильные, индивидуально запечатанные						
0,45	47	Белый	С сеткой	1000	HAWG	047 S1
0,7	47	»	»	1000	HCWG	047 S1
0,7	47	»	»	200	HCWG	047 S3
S-Рак, стерильные, индивидуально запечатанные, с абсорбирующими подложками						
0,45	47	Белый	С сеткой	1000	HAWG	047 S2
0,7	47	»	»	200	HCWG	047 S4
Взвешенные попарно						
0,8	47	Белый	Гладкие	50 пар	AAWP	047 OM
0,45	47	»	»	50 пар	HAWP	047 OM
Сверхтонкие (толщиной 25 мкм)						
0,30	13	Белый	Гладкие	100	THMP	013 00
0,30	14	»	»	100	THWP	014 00
0,30	25	»	»	100	THWP	025 00
0,30	47	»	»	100	THWP	047 00
0,30	102×102	»	»	5	THWP	102 FO
Сверхтонкие, взвешенные попарно						
0,30	13	Белый	Гладкие	20 пар	THWP	013 OM
Прямоугольные (10×42 мм)						
8,0	—	Белый	Гладкие	100	SCWP	019 OR
5,0	—	»	»	100	SMWP	019 OR
3,0	—	»	»	100	SSWP	019 OR
С гидрофобными краями (6 мм)						
5,0	47	Белый	Гладкие	100	SMEP	047 OW
5,0	90	»	»	100	SMEP	090 OW
3,0	47	»	»	100	SSEP	047 OW
3,0	90	»	»	100	SSEP	090 OW
1,2	47	»	»	100	RAEP	047 OW
0,8	47	»	»	100	AAEP	047 OW
0,45	47	»	»	100	HAEP	047 OW
0,45	90	»	»	100	HAEP	090 OW
0,22	47	Белый	Гладкие	100	GSEP	047 OW
С гидрофобными краями (6 мм), упакованные для автоклавирования						
0,45	47	Белый	Гладкие	100	HAEP	047 AW
0,45	47	»	С сеткой	100	HAEG	047 AW

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
С гидрофобными краями (6 мм), стерильно упакованные						
0,45	47	Белый	Гладкие	100	HAEP	047 SW
С гидрофобными краями (6 мм), упакованные для автоклавирования						
0,45	47	Белый	Гладкие	100	HAEP	047 AO
0,45	47	»	С сеткой	100	HAEG	047 AO
0,22	47	»	Гладкие	100	GSEP	047 AO
С гидрофобными краями (3 мм), стерильно упакованные						
0,45	47	Белый	Гладкие	100	HAEP	047 SO
0,45	47	»	С сеткой	100	HAEG	047 SO
0,22	47	»	Гладкие	100	GSEP	047 SO
Мембраны TF, слабо экстрагируемые водой						
1,2	142	Белый	Гладкие	50	RATF	142 50
1,2	293	»	»	25	RATF	293 25
0,8	293	»	»	25	AATF	293 25
0,65	293	»	»	25	DATF	293 25
0,45	13	»	Гладкие	100	HATF	013 00
0,45	25	»	»	100	HATF	025 00
0,45	47	»	»	100	HATF	047 00
0,45	142	»	»	50	HATF	142 50
0,45	293	»	»	25	HATF	293 25
0,30	292	»	Гладкие	25	PHTF	293 25
0,22	13	»	»	100	GSTF	013 00
0,22	25	»	»	100	GSTF	025 00
0,22	47	»	»	100	GSTF	047 00
0,22	142	»	»	10	GSTF	142 00
0,22	142	»	»	50	GSTF	142 50
0,22	293	»	»	25	GSTF	293 25
Складчатой конфигурации						
1,2	293	Белый	Гладкие	100	RAMT	293 00
0,45	293	»	»	100	HAMT	293 00
Мембраны Polyvic						
2,0	13	Белый	Гладкие	100	BSWP	013 00
2,0	25	»	»	100	BSWP	025 00
2,0	25	»	С сеткой	100	BSWG	025 00
2,0	47	»	Гладкие	100	BSWP	047 00
2,0	47	»	С сеткой	100	BSWG	047 00
2,0	90	»	Гладкие	100	BSWP	090 00
2,0	90	»	»	25	BSWP	090 25
2,0	142	»	»	10	BSWP	142 00
2,0	142	»	»	50	BSWP	142 50
2,0	293	»	»	5	BSWP	293 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
2,0	293	Белый	Гладкие	25	BSWP	293 25
0,6	13	»	»	100	BDWP	013 00
0,6	25	»	»	100	BDWP	025 00
0,6	47	»	»	100	BDWP	047 00
0,6	47	»	С сеткой	100	BDWG	047 00
0,6	90	»	Гладкие	100	BDWP	090 00
0,6	142	»	»	10	BDWP	142 00
0,6	142	»	»	50	BDWP	142 50
0,6	293	»	»	25	BDWP	293 25
Складчатой конфигурации						
0,6	293	Белый	Гладкие	100	BDMP	293 00
Для заправки мониторов, с тонкими абсорбирующими подложками						
2,0	37	Белый	Гладкие	100	BSWP	037 00
0,6	37	»	»	100	BDWP	037 00
Мембраны для щелочного элюирования						
2,0	25	Белый	Гладкие	100	BSAE	025 00
Мембраны Флюоропор						
3,0	13	Белый	Гладкие	100	FSLW	013 00
3,0	25	»	»	100	FSLW	025 00
3,0	47	»	»	100	FSLW	047 00
3,0	90	»	»	25	FSLW	090 00
3,0	142	»	»	10	FSLW	142 00
3,0	293	»	»	5	FSLW	293 00
3,0	203×254	»	»	5	FSLW	810 05
3,0	203×254	»	»	50	FSLW	810 50
1,0	13	Белый	Гладкие	100	FALP	013 00
1,0	25	»	»	100	FALP	025 00
1,0	47	»	»	100	FALP	047 00
1,0	90	»	»	25	FALP	090 25
1,0	90	»	»	50	FALP	090 50
1,0	142	»	»	10	FALP	142 00
1,0	142	»	»	50	FALP	142 50
1,0	293	»	»	5	FALP	293 00
1,0	293	»	»	25	FALP	293 25
1,0	203×254	»	»	5	FALP	810 05
1,0	203×254	»	»	50	FALP	810 50
0,5	13	Белый	»	100	FHLP	013 00
0,5	25	»	»	100	FHLP	025 00
0,5	47	»	»	100	FHLP	047 00
0,5	90	»	»	25	FHLP	090 50
0,5	90	»	»	50	FHLP	090 50
0,5	142	»	»	10	FHLP	142 00
0,5	142	»	»	50	FHLP	142 00
0,5	293	»	»	5	FHLP	293 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор. мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаков- ке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,5	293	Белый	Гладкие	25	FHLP	293 25
0,2	13	»	»	100	FGLP	013 00
0,2	25	»	»	100	FGLP	025 00
0,2	47	»	»	100	FGLP	047 00
0,2	90	»	»	25	FGLP	090 25
0,2	90	»	»	50	FGLP	090 50
0,2	142	»	»	10	FGLP	142 00
0,2	142	»	»	50	FGLP	142 50
0,2	293	»	»	5	FGLP	293 00
0,2	293	»	»	25	FCLP	293 25
Складчатой конфигурации						
3,0	293	Белый	Гладкие	20	FSMP	293 20
1,0	293	»	»	20	FAMP	293 20
0,5	293	»	»	20	FHMP	293 20
0,2	293	»	»	20	FGMP	293 20
Для заправки мониторов, с тонкими абсорбирующими подложками						
3,0	37	Белый	Гладкие	100	FSLW	037 00
1,0	37	»	»	100	FALP	037 00
0,5	37	»	»	100	FHLP	037 00
0,5	25	»	»	100	FHUP	025 00
0,5	47	»	»	100	FHUP	047 00
Мембраны Селотейт						
1,0	13	Белый	Гладкие	100	EAWP	013 00
1,0	25	»	»	100	EAWP	025 00
1,0	47	»	»	100	EAWP	047 00
1,0	90	»	»	25	EAWP	090 25
1,0	142	»	»	10	EAWP	142 00
1,0	293	»	»	25	EAWP	293 25
0,5	13	»	»	100	EHWP	013 00
0,5	24	»	»	120	EHWP	024 12
0,5	25	»	»	100	EHWP	025 00
0,5	47	»	»	100	EHWP	047 00
0,5	90	»	»	25	EHWP	090 25
0,5	142	»	»	10	EHWP	142 00
0,5	293	»	»	25	EHWP	293 25
0,2	13	»	»	100	EGWP	013 00
0,2	25	»	»	100	EGWP	025 00
0,2	47	»	»	100	EGWP	047 00
0,2	90	»	»	25	EGWP	090 25
0,2	142	»	»	10	EGWP	142 00
0,2	293	»	»	25	EGWP	293 25
Мембраны Митекс						
10,0	13	Белый	Гладкие	100	LCWP	013 00
10,0	13	»	С сеткой	100	LCWG	013 00
10,0	25	»	Гладкие	100	LCWP	025 00

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаковке, шт.	Тип, номер по каталогу	
10,0	25	Белый	С сеткой	100	LCWG	025 00
10,0	47	»	Гладкие	100	LCWP	047 00
10,0	47	»	С сеткой	100	LCWG	047 00
10,0	90	»	Гладкие	100	LCWP	090 00
10,0	90,0	»	»	25	LCWP	090 25
10,0	142	»	»	10	LCWP	142 00
10,0	142	»	»	50	LCWP	142 50
10,0	293	»	»	5	LCWP	293 00
10,0	293	»	»	25	LCWP	293 25
5,0	13	»	Гладкие	100	LSWP	013 00
5,0	13	»	С сеткой	100	LSWG	013 00
5,0	25	»	Гладкие	100	LSWP	025 00
5,0	25	»	С сеткой	100	LSWG	025 00
5,0	47	»	Гладкие	100	LSWP	047 00
5,0	47	»	С сеткой	100	LSWG	047 00
5,0	90	»	Гладкие	100	LSWP	090 00
5,0	90	»	»	25	LSWP	090 25
5,0	142	»	»	10	LSWP	142 00
5,0	142	»	»	50	LSWP	142 50
5,0	293	»	»	5	LSWP	293 00
5,0	293	»	»	25	LSWP	293 25

Для заправки мониторов, с тонкими абсорбирующими подложками

5,0	37	Белый	Гладкие	100	LSWP	037 00
-----	----	-------	---------	-----	------	--------

Мембраны для контроля воздуха PVC**Мембраны, не содержащие двуокиси кремния**

5,0	37	Белый	Гладкие	100	PVC5	037 00
-----	----	-------	---------	-----	------	--------

Серебряные мембраны для контроля воздуха

0,8	37		Гладкие	100	AG80	037 00
0,45	25		»	100	AG45	025 00

Мембраны для гибридизации [ДНК, РНК]**Нитроцеллюлозные мембраны для процесса Сазерна**

0,45	82	Белый	Гладкие	50	HANU	082 50
0,45	85	»	»	50	HANU	085 50
0,45	137	»	»	50	HANU	137 50
0,45	305×3048	»	»	305×3048	HANU	000 10
0,45	305×305	»	»	10	HANU	304 FO

Мембраны для выращивания бактериальных колоний

0,45	82	Белый	Гладкие	50	HATF	082 50
0,45	85	»	»	50	HATF	085 50

(Продолжение табл. П.2)

Размер пор, мкм	Диаметр, мм	Цвет	Описание	К-во в упаковке, шт.	Тип, номер по каталогу	
0,45	137	Белый	Гладкие	50	HATF	137 50
Мембраны гидрофобные Дюрапор для переноса пятен						
0,2	25	Белый	Гладкие	100	GVHP	025 00
0,2	293	»	»	25	GVHP	293 25
0,2	305×3048	»	»	305×3048	GVHP	000 10

Мембраны и сепараторы для кассетной системы Пелликон

Кассеты в комплекте (0,45 м² на упаковку)

Материал	НОММ или размер пор, мкм	Тип и номер по каталогу	
Целлюлоза	1 000	PCAC	000 05
Полисульфон	10 000	PTGC	000 05
Целлюлоза	10 000	PLGC	000 05
Полисульфон	30 000	PTTK	000 05
Полисульфон	100 000	PTHK	000 05
Полисульфон (жесткий задерживающий экран)	100 000	PTHK	000 05
Целлюлоза	1 000 000	PSVP	000 05
Дюрапор (жесткий задерживающий экран)	0,5	HYLP	000 C5
Пакеты в комплекте (0,05 м² на упаковку; требуются задерживающие экраны)			
Полисульфон	10 000	PTGC	000 01
Полисульфон	30 000	PTTK	000 01
Полисульфон	100 000	PTHK	000 01
	1 000 000	PSVP	000 01
Листы (0,002 м² каждый, 20 шт. в упаковке; требуются экраны для осадка и фильтрата)			
Нитроцеллюлоза	0,2	GSWP	OHV20
Нитроцеллюлоза	0,45	HAWP	OHV20
Нитроцеллюлоза	1,2	RAWP	OHV20
Ацетилцеллюлоза	0,2	EGWP	OHV20
Дюрапор	0,2	GVWP	OHV20
Дюрапор	0,5	HVLP	OHV20

Разделяющие сетки и экраны	К-во на упаковку, шт.	Номер по каталогу
Сетки с уретановыми краями (устанавливаются со стороны концентрата)	5	PSSP 0000

(Продолжение табл. П.2)

Разделяющие сетки и экраны	К-во на упаковку, шт	Номер по каталогу
Сетки с силиконовыми краями (устанавливаются со стороны концентрата)	10	PSSP OOR 10
Сетки с крупными отверстиями с силиконовыми краями (устанавливаются со стороны концентрата)	10	PSSP CRS 10
Сетки с силиконовыми краями (устанавливаются со стороны фильтрата)	11	PSSP OOF 11
Экраны с пазами линейного типа (устанавливаются со стороны концентрата)	10	PSSP LPC 10

Таблица П.3. Предфильтры и подложки для мембран фирмы «Миллипор корпорейшн»

Диаметр, мм	К-во в упаковке	Тип и номер по каталогу	Диаметр, мм	К-во в упаковке	Тип и номер по каталогу
Дисковые мембраны AP15					
22	100	AP15 022 00	90	100	AP15 090 00
25	100	AP15 025 00	124	50	AP15 124 50
42	100	AP15 042 00	142	50	AP15 142 50
47	100	AP15 047 00	257	25	AP15 257 25
75	100	AP15 075 00	293	25	AP15 293 25
Дисковые мембраны AP20					
10	100	AP20 010 00	75	100	AP20 075 00
13	100	AP20 013 00	90	100	AP20 090 00
20	100	AP20 020 00	124	50	AP20 124 50
22	100	AP20 022 00	142	50	AP20 142 50
25	100	AP20 025 00	257	25	AP20 257 25
35	100	AP20 035 00	275	100	APMS 275 00
42	100	AP20 042 00	293	25	AP20 293 25
47	100	AP20 047 00	293	100	APMS 293 00
Дисковые мембраны AP25					
10	100	AP25 010 00	90	100	AP25 090 00
13	100	AP25 013 00	124	50	AP25 124 50
18	100	AP25 018 00	127	50	AP25 127 50
20	100	AP25 020 00	142	50	AP25 142 50
22	100	AP25 022 00	257	25	AP25 257 25
25	100	AP25 025 00	275	20	APTS 275 20
35	100	AP25 035 00	293	25	AP25 293 25
42	100	AP25 042 00	293	20	APTP 293 20
47	100	AP25 047 00	293	20	APTS 293 20
75	100	AP25 075 00			
Дисковые стекловолоконные микрофильтры AP40 [только для анализа; нескрепленное микроволокно]					
24	500	AP40 025 05			
37	500	AP40 037 05			
47	500	AP40 047 05			

Таблица П.4. Подложки для мембран фирмы «Миллипор корпорейшн»

Описание	Диаметр, мм	К-во в упаковке, шт.	Номер по каталогу
Абсорбирующие подложки AP10			
Подложки	13	100	AP10 013 00
»	24	100	AP10 024 00
»	25	100	AP10 025 00
»	37	100	AP10 037 00
Стерильные	47	100	AP10 047 S0
Стерильные с распределителем	47	200	AP10 047 S1

Продолжение табл. П.4

Описание	Диаметр, мм	К-во в упаковке, шт.	Номер по каталогу
Подложки	47	100	AP10 047 00
»	142	50	AP10 142 S0
Толстые поддерживающие подложки AP30			
	34	100	AP30 034 P0
Тканые сетчатые прокладки AP32			
	42	100	AP32 042 00
	75	100	AP32 075 00
	124	10	AP32 124 00
	124	50	AP32 124 50
	257	5	AP32 257 00
	257	25	AP32 257 25
	275	100	AP32 275 0S

Таблица П.5. Ультрафильтры фирмы «Миллипор корпорейшн» (количество в упаковке: дисковые мембраны диаметром 13—76 мм 10 штук; диаметром 90—150 мм 5 штук)

Материал	НОММ	Тип	Диаметр, мм			
			13	25	43	47
Целлюлоза	1 000	PCAC	013 10	025 10	043 10	047 10
»	10 000	PLGC	013 10	025 10	043 10	047 10
Полисульфон	10 000	PTGC	013 10	025 10	043 10	047 10
»	30 000	PTTK	013 10	025 10	043 10	047 10
»	100 000	PTHK	013 10	025 10	043 10	047 10
Целлюлоза	1 000 000	PSVP	013 10	025 10	043 10	047 10

Продолжение табл. П.5

Материал	НОММ	Тип	Диаметр, мм				
			62	76	90	142	150
Целлюлоза	1 000	PCAC	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05
»	10 000	PLGC	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05
Полисульфон	10 000	PTGC	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05
»	30 000	PTTK	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05
»	100 000	PTHK	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05
Целлюлоза	1 000 000	PSVP	062 10	076 10	090 05	142 05	150 05

Таблица П 6. Дисковые мембраны фирмы «Нуклепор корпорейшн» (номера по каталогу)

Диаметр, мм	К-во в упаковке, шт.	Размер пор, мкм							
		12,0	10,0	8,0	5,0	3,0	2,0	0,1	0,8
13	100	110416	110415	110414	110413	110412	110411	110410	110409
25	100	110616	110615	110614	110613	110612	110611	110610	110609
37	100	110816	110815	110814	110813	110812	110811	110810	110809
43	100	111016	111015	111014	111013	111012	111011	111010	111009
47	100	111116	111115	111114	111113	111112	111111	111110	111109
50	100	111216	111215	111214	111213	111212	111211	111210	111209
76	100	111516	111515	111514	111513	111512	111511	111510	111509
90	10	111616	111615	111614	111613	111612	111611	111610	111609
90	25	111716	111715	111714	111713	111712	111711	111710	111709
90	100	111816	111815	111814	111813	111812	111811	111810	111809
142	10	112016	112015	112014	112013	112012	112011	112010	112009
142	25	112116	112115	112114	112113	112112	112111	112110	112109
142	50	112216	112215	112214	112213	112212	112211	112210	112209

(Продолжение табл. П.6)

Диаметр, мм	К-во в упаковке, шт.	Размер пор, мкм							
		0,6	0,4	0,2	0,1	0,08	0,05	0,03	0,015
13	100	110408	110407	110406	110405	110404	110403	110402	110401
25	100	110608	110607	110606	110605	110604	110603	110602	110601
37	100	110808	110807	110806	110805	110804	110803	110802	110801
43	100	111008	111007	111006	111005	111004	111003	111002	111001
47	100	111108	111107	111106	111105	111104	111103	111102	111101
50	100	111208	111207	111206	111205	111204	111203	111202	
76	100	111508	111507	111506	111505	111504	111503	111502	
90	10	111608	111607	111606	111605	111604	111603	111602	
90	25	111708	111707	111706	111705	111704	111703	111702	
90	100	111808	111807	111806	111805	111804	111803	111802	
142	10	112008	112007	112006	112005	112004	112003	112002	
142	25	112108	112107	112106	112105	112104	112103	112102	
142	50	112208	112207	112206	112205	112204	112203	112202	
293	10	112708	112707	112706					
293	25	112808	112807	112806					
293	100	112908	112907	112906					

Таблица П.7. Прямоугольные мембраны фирмы «Нуклепор корпорейшн»

Размер пор, мкм		Размер мембраны, мм	К-во в упаковке	Номер по каталогу	
12,0	(0,6)	19×42	100	113316	113308
12,0	(0,6)	203×254	10	113416	113408
12,0	(0,6)	203×254	25	113516	113508
12,0	(0,6)	203×254	100	113616	113608
10,0	(0,4)	19×42	100	113315	113307
10,0	(0,4)	203×254	10	113415	113407
10,0	(0,4)	203×254	25	113515	113507
10,0	(0,4)	203×254	100	113615	113607
8,0	(0,2)	19×42	100	113314	113306
8,0	(0,2)	203×254	10	113414	113406
8,0	(0,2)	203×254	25	113514	113506
8,0	(0,2)	203×254	100	113614	113606
5,0	(0,1)	19×42	100	113313	113305
5,0	(0,1)	203×254	10	113413	113405
5,0	(0,1)	203×254	25	113513	113505
5,0	(0,1)	203×254	100	113613	113605
3,0	(0,08)	19×42	100	113312	113304
3,0	(0,08)	203×254	10	113412	113404
3,0	(0,08)	203×254	25	113512	113504
3,0	(0,08)	203×254	100	113612	113604
1,0	(0,05)	19×42	100	113310	113303
1,0	(0,05)	203×254	10	113410	113403
1,0	(0,05)	203×254	25	113510	113503
1,0	(0,05)	203×254	100	113610	113603
0,8	(0,03)	10×42	100	113309	113302
0,8	(0,03)	203×254	10	113409	113402
0,8	(0,03)	203×254	25	113509	113502
0,8	(0,03)	203×254	100	113609	113602

Таблица П.8. Мембранные фильтры фирмы «Сарториус» (белые)

Размер пор, мкм	Материал мембраны	Номер по каталогу	Диаметр дисковых мембран и						
			13	20	24	25	30	37	40
8	Нитроцеллюлоза	SM11301	N	N	N	N	N	N	N
5	Нитроцеллюлоза	SM11342	N		N	N	N	N	N
5	Тефлон	SM11842	N			N		N	
3	Нитроцеллюлоза	SM11302	N		N	N	N	N	N
1,2	Нитроцеллюлоза	SM11303	N	N	N	N	N	N	N
1,2	Тефлон	SM11803	N			N		N	
1,2	Полиамид	SM11903	N			N	N		
1,2	Ацетилцеллюлоза	SM12303	N			N			
0,8	Ацетилцеллюлоза	SM11104	N	N	N	N	N	N	N
0,8	Нитроцеллюлоза	SM11304	N	N	N	N	N	N	N
0,8	Регенерированная целлюлоза	SM11604	N	N	N	N	N		N
0,8	Полиамид	SM11904	N	N	N	N			
0,65	Ацетилцеллюлоза	SM11105	N	N	N	N		N	
0,65	Нитроцеллюлоза	SM11305	N	N	N	N	N		N
0,65	Регенерированная целлюлоза	SM11605	N			N	N	N	
0,65	Полиамид	SM11905	N	N		N	N	N	
0,45	Ацетилцеллюлоза	SM11106	N	N		N	N	N	N
0,45	Нитроцеллюлоза	SM11306	N	N	N	N	N	N	N
0,45	Регенерированная целлюлоза	SM11606	N	N		N	N	N	N
0,45	Тефлон	SM11806	N			N		N	
0,45	Селласарт	SM12006	N	N		N	N		N
0,3	Нитроцеллюлоза	SM11347	N	N		N	N	N	N
0,2	Ацетилцеллюлоза	SM11107	N		N	N	N	N	N
0,2	Нитроцеллюлоза	SM11307	N	N	N	N	N	N	N
0,2	Регенерированная целлюлоза	SM11607	N			N		N	N
0,2	Тефлон	SM11807	N			N		N	
0,2	Селласарт	SM12007	N			N	N		N
0,15	Нитроцеллюлоза	SM11378	N			N	N		
0,1	Нитроцеллюлоза	SM11358	N	N		N	N		N
0,05	Нитроцеллюлоза	SM11328	N	N		N	N		N
0,01	Нитроцеллюлоза	SM11318	N			N	N	N	N

* Буквами обозначены следующие типы упаковок:

AAN — 100 шт. диаметром 59 мм; с отверстием в центре;

ACN — 100 шт.; стерильные, отдельно упакованные;

AGK — 50 шт. диаметром 72 мм; с отверстием в центре;

B — 5 шт., D — 10 шт., F — 15 шт., G — 25 шт., K — 50 шт., N — 100 шт., S — 200 шт.

Многие типы мембран Сарториус имеются также в виде листов размерами 320×640

размер упаковок *										
47	50	70	90	100	120	140	142	150	293	160×160
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F
N	N		G, N	G, N	G	G, N		G	D, G, N, AAN	F
N	N		G	G		D, G, N			B, G	
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F
N, ACN	N, ACN		G, N	G, N	G	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F
N	N		G	G		D, G, N			B, G	
N	N			G, N						
N	N		N	N		G, N				
N	N									
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G, N		G, N	D, G, N, AAN	F, N
N	N, ACN		G, N	G, N	G	G, N		G, N	D, G, N, AAN	F
N	N, ACN		G	G, N		G, N		G, N	D, G, N	
N	N			G, N						
N	N		G	G, N	G	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F
N, ACN	N, ACN		G, N	G, N	G	G	G, N		D, G, N, AAN	F, N
N	N	G	G	G		G, N			D, G, N, AAN	
N	N		G	G, N		G, N			D, G	
N	N		G	G, N		G, N				
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G			D, G, N, AAN	F, N
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F, N
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N			G, N	G	D, G, N	
N	N		G	G			G, N		B, G	
N	N	G	G, N	G, N	G	G	D, G, N	G	G, N, AAN	F, N
N	N		G	N	G, N	G	G, N	G	D, G, N, AAN	F, N
N	N									
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N	G	G	G, N		D, G, N, AAN	F, N
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G		G	G, N	G	D, G, N, AAN	F, N
N, ACN	N, ACN	G	G, N	G, N			G, N	G	D, G, N	
N	N		G	G, N	G	G	G, N		B, G	
N	N	G	G, N	G, N	G		D, G, N		G, N, AAN	F, N
N	N		G, N	G, N			G, N	G	G, N	F
N	N	G	G, N	G, N	G	G, N		G	D, G, N	F, N
N	G	N		G, N		G, N		G		F
N	G	G		G, N		G		G		F

Таблица П.9. Мембранные фильтры фирмы «Сарториус» для микробиологических и аналитических целей

Размер пор. мкм	Материал мембраны	Цвет	Цвет сетки	Особенности	Номер по каталогу	Диаметр мембран (мм) и тип упаковки *				
						13	24	25	47	80
12	Нитроцеллюлоза	Белый	—	—	SM 12500	N	N	N	ACN	N, ACN
8	Нитроцеллюлоза	Серый	Белый	—	SM 13001	N	N			N
8	Нитроцеллюлоза	Белый	Черный	Гидрофобные края	SM 13101	N	N	N	AHN	N, AHN
3	Желатин	»	—	—	SM 12602		ALN			ALN
1,2	Нитроцеллюлоза	»	Черный	—	SM 11403	N	N	N	ACN	N, ACN
0,8	Нитроцеллюлоза	»	Черный	—	SM 11404	N	N	N	ACN	N, ACN
0,8	Нитроцеллюлоза	Серый	Белый	—	SM 13004	N	N	N	ACN	N, ACN
0,8	Нитроцеллюлоза	Белый	Черный	Стерильные, с абсорб. подложкой	SM 13704		ALN			ALN
0,65	Нитроцеллюлоза	Белый	Черный	—	SM 11405	N	N	N	ACN	N, ACN
0,65	Нитроцеллюлоза	Серый	Белый	—	SM 13005	N	N	N	ACN	N, ACN
0,45	Нитроцеллюлоза	Белый	—	Свободные от фосфатов	SM 11306		PFN			PFN
0,45	Нитроцеллюлоза	»	—	—	SM 11336	N	N	N		
0,45	Нитроцеллюлоза	»	Черный	—	SM 11406	N	N	N	ACN	N, ACN
0,45	Нитроцеллюлоза	Серый	Белый	—	SM 13006	N	N	N	ACN	N, ACN
0,45	Нитроцеллюлоза	Белый	Черный	Гидрофобные края	SM 13106	N	N	N	ACN	N, ACN
0,45	Ацетилцеллюлоза	»	»	»	SM 13506		HCN, HEN			
0,45	Нитроцеллюлоза	»	»	Стерильные, с абсорб. подложкой	SM 13706		ALN			ALN
0,45	Нитроцеллюлоза	Зеленый	Зеленый	—	SM 13806	N	N	N	ACN	N, ACN
0,45	Нитроцеллюлоза	Белый	»	—	SM 13906		R, ACR			R, ACR
0,2	Нитроцеллюлоза	Белый	Черный	—	SM 11407		N, ACR, APR			R, ACR, APR
0,2	Нитроцеллюлоза	»	»	Гидрофобные края	SM 13107	N	N	N	ACN	N, ACN
0,2	Ацетилцеллюлоза	»	»	То же	SM 13507	N	N	N	ACN	N, ACN
0,2	Ацетилцеллюлоза	»	»	Стерильные, с абсорб. подложкой	SM 13707		ALN			ALN

* Буквы, обозначающие типы упаковки: ACN — 100 шт., стерильные отдельно упакованные; ACR — 1000 шт., стерильные, отдельно упакованные; APR — 1000 шт., стерильные, отдельно упакованные (10 пачек по 100) и двумя распределителями; AHN — 100 шт. без сетки; ALK — 50 шт., стерильные, упакованные вместе; ALN — 100 шт., стерильные, упакованные вместе; HCN — 100 шт. с гидрофобными краями (6 мм); HEN — 100 шт. с гидрофобными краями (6 мм); HEN — 100 шт., стерильные, отдельно упакованные; N — 100 шт.; PEN — 100 шт., свободные от фосфатов. Многие типы имеются также в виде листов с размерами 320×640 мм.

Литература

1. *American Industrial Hygiene Association*. Рекомендуемая техника отбора проб и подсчета асбестовых волокон. Amer. Industr. Hygiene Assoc. J., February 1975, pp. 83—90.
2. *American Public Health Association*. Методы отбора проб и анализа воздуха. 2nd ed. Amer. Public Helth Assoc., Washington, D. C., pp. 984, 1977.
3. *American Public Health Association*. Стандартные методы проверки воды и сточных вод. 15th ed. Amer. Public Health Assoc., Washington, D. C., 1981.
4. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 24. Стандартный метод регистрации и подсчета частиц, загрязняющих поверхности. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
5. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 25. Стандартный метод замера и подсчета частиц из воздуха в особо чистых помещениях, предназначенных для производства электронной и другой прецизионной аппаратуры. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
6. *American Society for Testing and Materials*. Standard E 20. Анализ распределения по размерам частиц доситовой величины с помощью микроскопических методов. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
7. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 312. Стандартные методы микроскопического определения размера и подсчета частиц на мембранных фильтрах в жидкостях, используемых в аэрокосмической промышленности, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
8. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 318. Стандартные способы отбора проб частиц из воздуха в особо чистых помещениях при работе с жидкостями, используемыми в аэрокосмической промышленности. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
9. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 488. Стандартный тест для подсчета общего содержания бактерий в воде. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
10. *American Society for Testing and Materials*. Standard D 2009. Определение массы, числа, а также оптическая калибровка атмосферных частиц с помощью фильтрации. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
11. *American Society for Testing and Materials*. Standard D 3508. Стандартный метод оценки мембранных фильтров для проверки воды на присутствие ФКП. Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia.
12. *American Society for Testing and Materials*. Standard D 3861. Количественное содержание в мембранных фильтрах веществ, экстрагируемых водой. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
13. *American Society for Testing and Materials*. Standard D 3862. Задерживающие свойства мембранных фильтров с диаметром пор 0,2 мкм, используемых при обычной фильтрации для микробиологической оценки качества воды. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.

14. *American Society for Testing and Materials*. Standard D13863. Задерживающие свойства мембранных фильтров с диаметром пор 0,40—0,45 мкм, используемых при обычной фильтрации для микробиологической оценки качества воды. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
15. *American Society for Testing and Materials*. Standard E 128. Максимальный диаметр пор и проницаемость жестких пористых мембран для лабораторного применения. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
16. *American Society for Testing and Materials*. Standard F 316. Размеры пор мембранных фильтров, используемых при работе с жидкостями аэрокосмического назначения. Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia.
17. *Avis K. E., Akers M. J.* Sterile preparation for the hospital pharmacist, Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI., 1982.
18. *Baath E., Soderstrom B.* Сравнение методов, использующих пленку агара и мембранные фильтры, для оценки длин нитей грибницы в почве.— *Soil Biol. and Biochem.*, 12, 385—387 (1980).
19. *Bartley T. D., Quan T. J., Collins M. T., Morrison S. M.* Метод мембранной фильтрации для выделения *Yersinia enterocolitica*.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 829—834 (1982).
20. *Baskin A., Lyman D. J., Meltzer T. H.* Теоретическое рассмотрение метода точки пузырька: смачивание твердого тела жидкостью.— *Pharm. Technol.*, 3, January 1979.
21. *Beaudoin E. C., Litsky W.* Fecal streptococci, pp. 77—118.— In: *Membrane filtration: applications, techniques, and problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
22. *Bechhold H.* Изучение коллоидов методом фильтрации.— *Zs. Phys. Chemie*, 60, 257—318 (1907).
23. *Belfort G., Rotem-Borenstajn Y., Katznelson E.* Концентрирование вирусов с помощью мембран из полых волокон: что дальше?— *Progr. Water Technol.*, 10, 357—364 (1978), Pergamon Press.
24. *Belly R. T., Bohlool B. B., Brock T. D.* Род *Thermoplasma*.— *Ann. New York Acad. Sci.*, 225, 94—107 (1973).
25. *Berman D., Rohr M.-E., Safferman R. S.* Концентрирование полиовируса в воде с помощью молекулярной фильтрации.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 426—428 (1980).
26. *Binek B., Przyborowski S.* Влияние электростатических зарядов мембранных фильтров на эффективность разделения.— *Staub*, 25, 10—13 (1965).
27. *Biro G., Merka V.* Изготовление и использование растворимых фильтров при микробиологическом контроле воды (на чешск. языке).— *Ceskosl. epidemiol. mikrobiol. imunol.*, 16, 350—353 (1967).
28. *Bisson J. W., Cabelli V. J.* Метод подсчета бактерий *Clostridium perfringens* с помощью мембранных фильтров.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 55—66 (1979).
29. *Bitton G.* Introduction to Environmental Virology, John Wiley, New York, 1980.
30. *Blenk H., Junge W., Blenk B.* Флюоресцентно-серологическое определение микроколоний гонорейных бактерий *Neisseria* с помощью мембранных фильтров.— *I. Abteilung Original A* 240, 480—488 (1978).
31. *Block J. C., Joret J. C., Hartemann P., Schwartzbrod L., Dixneuf P.* Альгинатные фильтры для концентрирования энтеровирусов из водных сред: возможности метода.— *Zentralblatt Bakteriologie, I. Abteilung Originale*, B 165, 471—477 (1977).
32. *Block J. C., Rolland D.* Метод концентрирования бактерий *Salmonella* из воды при pH 3,5 с помощью стекловолоконных микрофильтров.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 1—6 (1979).
33. *Bordner R., Winter J., Scarpino P.* Микробиологические методы контроля окружающей среды. U. S. Environmental Protection Agency Document EPA-600/8-78-017, Cincinnati, 1978.

34. *Proceedings of the Symposium on the Recovery of Indicator Organisms Employing Membrane Filters* (eds. R. H. Bordner, C. F. Frith, J. A. Winter), U. S. Environmental Protection Agency Document EPA-600/9-77-024, Cincinnati, 1977.
35. *Bovre K., Lozeron H. A., Szubalski W.* Методы гибридизации РНК-ДНК в растворе с целью изучения транскрипции вирусов.— *Methods in Virology*, 5, 271—292 (1971).
36. *Bowen B., Steinberg J., Laemmli U. K., Weintraub H.* Обнаружение ДНК-связывающих белков методом белковых пятен.— *Nucl. Acids Res.*, 8, 1—20 (1980).
37. *Bower J. P., Kilham O. W.* Оценка органических примесей, содержащихся в мембранных фильтрах, и их действие на БГКП, Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, p. 212, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1978.
38. *Bowman F. W., Calhoun M. P., White M.* Микробиологические методы контроля качества мембранных фильтров, *J. Pharm. Sci.*, 56, 222—225 (1967).
39. *Brock T. D.* Использование флуоресцентной микроскопии для подсчета фитопланктона, в частности нитевидных сине-зеленых водорослей.— *Limnol. Oceanogr.*, 23, 158—160 (1978).
40. *Brown O. R.* Ингибирование *E. coli* на ацетилцеллюлозных мембранных фильтрах.— *Microbios*, 7, 235—240 (1973).
41. *Buck J. D.* *Candida albicans*, pp. 139—147.— In: *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*, ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
42. *Burleigh E. G., Wakeham H., Honold E., Skau E. L.* Распределение по размерам в текстильных изделиях.— *Textile Res. J.*, 19, 547—555 (1949).
43. *Cabelli V. J.* *Clostridium perfringens* as a water quality indicator, pp. 65—79.— In: *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*, ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
44. *Cahn R. D.* Детергенты в мембранных фильтрах.— *Sci.*, 155, 195, 196 (1967).
45. *Carson L. A., Petersen N. J., Favero M. S., Doto I. L., Collins D. E., Levin M. A.* Факторы, влияющие на обнаружение и подсчет бактерий *Pseudomonas aeruginosa* с помощью методов НВЧ и мембранной фильтрации.— *Appl. Microbiol.*, 30, 935—942 (1975).
46. *Chandler F. W., Clark J. W.* Прохождение бактерий *Treponema pallidum* через мембранные фильтры с порами различного размера.— *Appl. Microbiol.*, 19, 326—328 (1970).
47. *Clark H. F., Geldreich E. E., Jeter H. L., Kabler P. W.* Мембранная фильтрация в санитарной бактериологии.— *Publ. Health Rep.* 66, 951—977 (1951).
48. *Clive D., Landman O. E.* Обратный переход протопластов *Bacillus subtilis* в бациллярную форму, индуцируемый экзогенной клеточной стенкой, бактериями и ростом на мембранных фильтрах.— *J. Gen. Microbiol.*, 61, 233—243 (1970).
49. *Cole J. C., Farris J. A., Nickolaus N.* Cartridge filters.— In: *Filtration: principles and practices. Part. II.* (ed. C. Orr), Marcel Dekker, New York, 1979, pp. 201—259.
50. *Colwell R. R., Kaper J.* Разновидности *Vibrio* как бактериальные индикаторы потенциальных опасностей для здоровья, связанных с водой, pp. 115—125.— In: *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*, ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
51. *Colwell R. R., Kaper J. B.* *Vibrio* and *Aeromonas*, pp. 161—188.— In:

- Membrane filtration: applications, techniques and problems (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
52. Cotton R. A., Fifield C. W. Standardization of membrane filters for microbiological applications, pp. 19—39.— In: Membrane Filtration, Application, Techniques and Problems (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
 53. Cotton R. A., Sladek K. J., Sohn B. I. Оценка работы монитора для одноступенчатого контроля бактериальной загрязненности.— J. Amer. Water Works Assoc., 67, 449—451 (1975).
 54. Craythorn J. M., Barbour A. G., Matsen J. M., Britt M. R., Garibaldi R. A. Контактный метод с применением мембранных фильтров для отбора бактериологических проб с влажных поверхностей.— J. Clin. Microbiol., 12, 250—255 (1980).
 55. Daley R. J. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations and comparative accuracy, pp. 29—45.— In: Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology (eds. J. W. Costerton, R. R. Colwell), ASTM Special Techn. Public. 695, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1979.
 56. Daley R. J., Hobbie J. E. Прямой подсчет водных бактерий с помощью модифицированной эпифлюоресцентной техники.— Limnol. Oceanogr., 20, 875—881 (1975).
 57. Daubner I., Peter H. Membranfilter in der Mikrobiologie des Wassers, Walter de Gruyter, Berlin, 1974.
 58. Dawson H., Jones M. V. Использование мембранных фильтров для изучения развития плодовых тел *Mucococcus xanthus*.— J. Gen. Microbiol., 114, 217—220 (1979).
 59. De Ley J., De Smedt J. Усовершенствования метода мембранной фильтрации с целью гибридизации ДНК: г. РНК.— Antonie van Leeuwenhoek, 41, 287—307 (1975).
 60. Delaney R. A. M., Donnelly J. K. Применение обратного осмоса в молочной промышленности, pp. 417—444.— In: Reverse Osmosis and Synthetic Membranes (ed. S. Sourirajan), National Research Council of Canada Publication No. 15627, Ottawa, Canada, 1977.
 61. Denhardt D. T. Метод мембранной фильтрации для обнаружения комплементарной ДНК.— Biochem. Biophys. Res. Commun., 23, 641—646 (1966).
 62. Dodson A. N., Thomas W. H. Концентрирование планктона в мягких условиях.— Limn. Oceanogr., 9, 455, 456, (1964).
 63. Drake W. J., Elgie J. R., Nichols G. Действие мембранных фильтров на ингибирующие красители в твердой среде.— J. Med. Lab. Technol., 27, 37—42 (1970).
 64. Dutka B. J. Membrane filtration. Application, techniques and problems, Marcel Dekker, New York, 1981.
 65. *Pseudomonas aeruginosa*: условно патогенный индикатор, pp. 119—128.— In: Membrane filtration: application, techniques and problems (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
 66. Dwyer J. L. Filtration in the food, beverage and pharmaceutical industries, pp. 121—199.— In: Filtration: Principles and Practices, Part II (ed. C. Orr), Marcel Dekker, New York, 1979.
 67. Edmondson W. T. Counting zooplankton samples, pp. 133—135.— In: A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters (eds. W. T. Edmonds, G. G. Winberg), Blackwell, Oxford, 1971.
 68. Elford W. J. Принципы ультрафильтрации применительно к биологическим исследованиям.— Proc. Roy. Soc., 112B, 384—406 (1933).
 69. Elford W. J. Принципы изготовления мембран с калиброванными порами. Ультрафильтрационные свойства мембран «градокол».— Trans. Faraday Soc., 33, 1094—1106 (1937).

70. *European Pharmacopoeia*, Maisonneuve, Paris, 1978.
71. *Fan K.-C., Gentry J. W.* Забивание мембран «Нуклепор». — *Sci Technol.*, 12, 1289—1294 (1978).
72. *Farrah S. R., Bitton G.* Эволюция полиовируса, адсорбированного на мембранных фильтрах. — *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 982—984 (1978).
73. *Farrah S. R., Gerba C. P., Wallis C., Melnick J. L.* Концентрирование вирусов из больших объемов водопроводной воды с помощью гофрированных мембранных фильтров. — *Environ. Microbiol.*, 31, 221—226 (1976).
74. *Fifield C. W.* Sterilization filtration, pp. 562—591. — In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 2nd ed. (ed. S. S. Block), Lea and Febiger, Philadelphia, 1977.
75. *Fleischer R. L., Price P. B., Symes E. M.* Новый фильтр для биологических материалов. — *Sci.*, 143, 249, 250 (1964).
76. *Fournier R. O.* Membrane filtering, pp. 108—112. — In: *Phytoplankton Manual* (ed. A. Sournia), Unesco, Paris, 1978.
77. *Francisco D. E., Mah R. A., Rabin A. C.* Эпифлюоресцентная техника с использованием акридина оранжевого для подсчета бактерий в естественных водах. — *Trans. Amer. Microscop. Soc.*, 92, 416—421 (1973).
78. *Frith C. F.* Membrane filters in industry, pp. 567—606. — In: *Membrane filtration: application, techniques and problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
79. *Gabridge M. G.* Культивирование микоплазм на подложках из эфиров целлюлозы. — *Appl. Microbiol.*, 26, 414—416 (1973).
80. *Gebott M. D., Marschall J. C., Meltzer T. H.* Polymeric parameters of cellulosic support media affecting serum protein electrophoresis, pp. 211—233. — In: *Membranes from Cellulose and Cellulose Derivatives* (ed. A. F. Turbak), Applied Polymer Symposia No. 13. John. Wiley, New York, 1970.
81. *Geldreich E. E.* Handbook for evaluating water bacteriology laboratories. Publication EPA-670/9-75-006, U. S. Environmental Protection, Agency, Cincinnati, 1975.
82. *Geldreich E. E.* Performance variability of membrane filter procedures, pp. 12—19. — In: *Proceeding of the symposium on the recovery of indicator organisms employing membrane filters* (eds. R. H. Bordner, C. F. Frith, J. A. Winter), U. S. Environmental Protection Agency Publication EPA-600/9-77-024, U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, 1977.
83. *Geldreich E. E., Clark H. F., Huff C. B., Best L. C.* Питательная среда для ФКП при работе с мембранными фильтрами. — *Amer. Water Works Assoc.*, 57, 208—214 (1965).
84. *Gelman C., Meltzer T. H.* Использование мембранных фильтров для анализа воздуха. — *Anal. Chem.*, 51, 22A—31A (1979).
85. *Gelman C., Mehta D. V., Meltzer T. H.* Новые материалы для фильтров, используемых при анализе твердых частиц и следов металлов в воздухе. — *Amer. Ind. Hygiene Assoc. J.*, 40, 926—932 (1979).
86. *Gill T. J.* Principles of Radiomunoassay, pp. 169—171. — In: *Manual of Clinical Immunology* (eds. N. R. Rose, H. Friedman), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1976.
87. *Gillespie D., Spiegelman S.* Количественный анализ гибридов ДНК-РНК с помощью ДНК, иммобилизованной на мембране. — *J. Molec. Biol.*, 12, 829—842 (1965).
88. *Gillis J. R., Powell K. P., Halleck F. E.* Новый метод выделения бактериальных спор, взвешенных в нефти. — *Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol.*, P 20, p. 203 (1975).¹
89. *Goetz A., Tsuneishi N.* Применение мембранных молекулярных фильтров

- для бактериологического анализа воды.— J. Amer. Water Works Assoc., 43, 943—984 (1951).
90. Goyal S. M., Gerba C. P. Простой метод концентрирования бактерий из больших объемов водопроводной воды.— Appl. Environ. Microbiol., 40, 912—916 (1980).
91. Goyal S. M., Zerda K. S., Gerba C. P. Концентрирование колифагов из больших объемов воды и сточных вод.— Appl. Environ. Microbiol., 39, 85—91 (1980).
92. Goyal S. M., Hanssen H., Gerba C. P. Простой метод концентрирования вируса гриппа из аллантоиновой жидкости на микропористых фильтрах.— Appl. Environ. Microbiol., 39, 500—504 (1980).
93. Grabow W. O. K. Membrane filtration: a South African view, pp. 355—392.— In: Membrane filtration: applications, techniques and problems (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
94. Green B. L., Clausen E., Litsky W. Сравнение новых мембран Миллипор НС с обычными мембранными фильтрами для подсчета бактерий ФКП.— Appl. Microbiol., 30, 697—699 (1975).
95. Griffiths R. P., Hanus F. J., Morita R. Y. Фильтрация методом «обратного потока» применительно к исследованиям морских микроорганизмов.— Appl. Microbiol., 26, 687—691 (1973).
96. Hazey G. Точка зрения обслуживающего персонала.— Amer. City, November 1958, pp. 116—118.
97. Heidam N. Z. Обзор: фракционирование аэрозолей последовательной фильтрацией на мембранах Нуклепор.— Atm. Environ., 15, 891—904 (1981).
98. Heilmann K. Therapeutic systems, Georg Thieme, Stuttgart, 1978.
99. Hein W. Микрофильтрация. Методы критической оценки разделения и очистки жидкостей и газов.— Chem. Produkt., November 1980, s. 6, 8, 10, 12, 13, 20, 22.
100. Helmcke J. G. Новые данные о структуре мембранных фильтров.— Kolloid Zs., 135, 29—43 (1954).
101. Helmstetter C. E. Скорость синтеза ДНК во время цикла деления, *E. coli* В/г.— J. Mol. Biol., 24, 417—427 (1967).
102. Helmstetter C. E., Cummings D. J. Улучшенный способ отбора бактериальных клеток в процессе деления.— Biochim. Biophys. Acta, 82, 608—610 (1964).
103. Highsmith A. K., Feeley J. C., Morris G. K. Isolation of *Yersinia enterocolitica* from water, pp. 265—274.— In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water. ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
104. Hoadley A. W. Potential health hazards associated with *Pseudomonas aeruginosa* in water, pp. 80—114.— In: Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water. ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
105. Hoadley A. W. Effect of injury of the recovery of bacteria on membrane filters, pp. 413—450.— In: Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
106. Bacterial indicators/health hazards associated with water (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), ASTM Special Technical Publication 635, Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
107. Hobbie J. E., Poteroy L. B. Экспериментальное концентрирование водных микроорганизмов.— Verhand. Intern. Verein Limnol., 18, 696—700 (1972).
108. Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S. Применение мембран Нуклепор для подсчета бактерий методом флуоресцентной микроскопии.— Appl. Environ. Microbiol., 33, 1225—1228 (1977).

109. *Holm-Hansen O., Packard T. T., Pomeroy L. R.* Эффективность техники фильтрации методом «обратного потока» для концентрирования частиц.— *Limnol. Oceanogr.*, 15, 832—835 (1970).
110. *Honold E., Skau E. L.* Применение метода ртутной интрузии для определения распределения размеров пор мембранных фильтров.— *Sci.*, 120, 805, 806 (1954).
111. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13th ed. (ed. W. Horwitz), Assoc. Official Anal. Chem., Washington, D. C., 1980.
112. *Hou K., Gerba C. P., Goyal S. M., Zerda K. S.* Задержка фильтрами с измененным зарядом латексных пузырьков, бактерий, эндотоксина и вирусов.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 892—896 (1980).
113. *Hsu S. C., Williams T. J.* Оценка факторов, влияющих на технику мембранной фильтрации при контроле питьевой воды.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 453—460 (1982).
114. *Hwang S.-T., Kammermeyer K.* Membranes in separations, John Wiley, New York, 1975. [Имеется перевод: Хванг С.-Т., Каммермейер К. Мембранные процессы разделения.— М.: Химия, 1981, 464 с.]
115. *Jacobs S.* Ультрафильтрационные мембраны в биохимии.— *Methods Biochem. Anal.*, 22, 307—354 (1974).
116. *Jakubowski W., Hoff J. C., Anthony N. C., Hill W. F.* Эпоксистекловолоконный адсорбент для концентрирования вирусов из больших объемов питьевой воды.— *Appl. Microbiol.*, 28, 501, 502 (1974).
117. *Jameson T. A., Meltzer T. H.* A review of cellulosic membrane applications to air, water and biological fluids filtration, pp. 282, 283.— In: *Membranes from Cellulose and Cellulose Derivatives* (ed. A. F. Turbak), Appl. Polymer Symp. No. 13, Amer. Chem. Soc., John Wiley, New York, 1970.
118. *Johnston P. R., Meltzer T. H.* К вопросу об угрожающем уровне содержания микроорганизмов при оценке эффективности стерилизующих фильтров.— *Pharm. Techn.*, 3, 66—71 (1979).
119. *Johnston P. R., Lukaszewicz R. C., Meltzer T. H.* О некоторых погрешностях при точечных измерениях пузырьков.— *J. Parent. Sci. Techn.*, 35, 36—39 (1981).
120. *Jones J. G.* A guide to methods for estimating microbial numbers and biomass in fresh water, Sci. Public. No. 39, Freshwater Biol. Assoc., Windermere, England, 1979.
121. *Jordan M. J., Daley R. J., Lee K.* Усовершенствованная техника фильтрации при изучении поглощения радиоактивного сульфата в пресной воде.— *Limnol. Oceanogr.*, 23, 154—157 (1978).
122. *Jost R., Fey H.* Быстрое обнаружение малых количеств бактерий из воздуха с помощью техники мембранной фильтрации с флюоресцентными антителами.— *Appl. Microbiol.*, 20, 861—865 (1970).
123. *Kabler P. W., Clark H. F.* Применение дифференциальных сред при работе с мембранными фильтрами.— *American J. Public Health*, 42, 390—392 (1952).
124. *Kesting R. E., Murray A., Jackson K., Newman J.* Высокоанизотропные микрофильтрационные мембраны.— *Pharm. Techn.*, 4, 53—60 (1981).
125. *Kesting R. E.* Synthetic polymeric membranes, McGraw-Hill, New York, 1971.
126. *Kesting R. E.* Asymmetric cellulose acetate membranes, pp. 89—110.— In: *Reverse Osmosis and Synthetic Membranes* (ed. S. Sourirajan), Nat. Res. Council Canada Public. No. 15627, Ottawa, Canada, 1977.
127. *Klinkowski P. R.* Ультрафильтрация: экспресс-испытания.— *Chem. Eng.*, May 8, 164—173 (1978).
128. *Ko J. H., Vanderwyk R. W.* Техника мембранной фильтрации для

- испытания бактериальной активности иодофоров.— *J. Pharm. Sci.*, 57, 2013—2015 (1968).
129. *Koller W., Rotter M.* Исследование пригодности желатиновых фильтров для сбора микроорганизмов из воздуха.— *Zs. Bakteriол. Hygiene, I. Abteilung Original*, В 159, 546—559 (1974).
 130. *Kunicka-Goldfinger W.* Попытка измерения роста индигенных водных бактерий методом полунепрерывного культивирования на мембранных фильтрах.— *Bull. Ecolog. Res. Comm. (Stockholm)*, 17, 311—315 (1973).
 131. *Kunicka-Goldfinger W., Stronkowska E.* Определение числа активных сапрофитных водных бактерий методом полунепрерывного культивирования на мембранных фильтрах.— *Acta Microbiol. Polon.*, 26, 199—205 (1977).
 132. *Leahy T. J., Ryan M. J.* Задержка бактерий фильтрами, используемыми для осветления вин.— *Amer. Soc. Enolog. Ann. Meet.*, June 28, 1980, Los Angeles.
 133. *Leahy T. J., Sullivan M. J.* Подтверждение способности мембранных фильтров задерживать бактерии.— *Pharm. Techn.*, 2, 65—75 (1978).
 134. *Lemeshow S., Litsky W.* Классификация мембранных фильтров.— *ASM News*, 46, 601 (1980).
 135. *Levin M. A.* Bifidobacteria as water quality indicators, pp. 131—138.— In: *Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water*. ASTM STP 635 (eds. A. W. Hoadley, B. J. Dutka), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, 1977.
 136. *Levin M. A., Resnick I. G.* *Bifidobacterium*, pp. 129—159.— In: *Membrane filtration: applications, techniques and problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
 137. *Levin M. A., Cabelli V. J.* Техника мембранной фильтрации для подсчета *Pseudomonas aeruginosa*.— *Appl. Microbiol.*, 24, 864—870 (1972).
 138. *Levin M. A., Fischer J. R., Cabelli V. J.* Количественный метод массового отбора проб.— *Appl. Microbiol.*, 28, 515—517 (1974).
 139. *Libby D. V., Cronin J. J., Cunningham L. L.* Влияние анизотропии на микрофильтрацию через мембраны из смешанных эфиров целлюлозы.— *J. Parent. Sci. Techn.*, 35, 276—280 (1981).
 140. *Linch A. L.* Оценка качества окружающего воздуха путем личного контроля.— *CRC Press*, Cleveland, 1974.
 141. *Lorenz R. C., Hsu J. C., Tuovinen O. H.* Характеристические различия, классификация и выборный анализ мембранных фильтров для подсчета ФКП в речной воде.— *J. Amer. Water Works Assoc.*, 74, 429—437 (1982).
 142. *Lukaszewicz R. C.* Санитарная профилактика крупномасштабных производств и систем питьевой воды с помощью микропористых фильтров.— *Pharm. Techn.*, Vol. 3, August 1979.
 143. *Lukaszewicz R. C., Meltzer T. H.* К вопросу об обоснованности использования фильтров.— *J. Parent. Drug. Assoc.*, 33, 187—194 (1979).
 144. *Lukaszewicz R. C., Meltzer T. H.* О структурной совместимости мембранных фильтров.— *J. Parent. Drug Assoc.*, 34, 463—472 (1980).
 145. *Lukaszewicz R. C., Tanny G. B., Meltzer T. H.* Характеристики мембранных фильтров и их значение для задержки частиц.— *Pharm. Techn.*, 2, 77—82 (1978).
 146. *Marshall J. C., Meltzer T. H.* Некоторые вопросы пористости мембранных фильтров: распределение пор по размерам и анизотропия.— *Bull. Parent. Drug Assoc.*, 30, 214—225 (1976).
 147. *Marshall R. D., Storrow J. A.* Диализ растворов каустической соды.— *Ind. Eng. Chem.*, 43, 2934—2942 (1951).
 148. *Maxted W. R.* Specific procedures and requirements for the isolation, growth and maintenance of the L-phase of some microbial groups, pp. 444, 445.— In: *Methods in Microbiology*, Vol. 7A (eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons), Academic Press, London, 1972.

149. *McFeters G. A., Stuart D. G.* Выживаемость бактерий колиформ в естественных водах: полевые и лабораторные исследования в ячейках с мембранными фильтрами.— *Appl. Microbiol.*, 24, 805—811 (1972).
150. *McNabb C. D.* Подсчет пресноводного фитопланктона, сконцентрированного на мембранном фильтре.— *Limnol. Oceanogr.*, 5, 57 (1960).
151. *Meyer-Reil L.-A.* Bacterial growth rates and biomass production, pp. 223—236.— In: *Microbial Ecology of a Brackish Water Environment* (ed. G. Rheinheimer), Springer-Verlag, 1977.
152. *Michaels A. S.* Синтетические полимерные мембраны: практическое применение — прошлое, настоящее и будущее.— *Pure Appl. Chem.*, 46, 193—204 (1976).
153. *Model F. S., Davis H. J., Poist J. E.* PBI membranes for reverse osmosis, p. 233.— In: *Reverse osmosis and synthetic membranes* (ed. S. Sourirajan), Nat. Res. Coun. Canada, Ottawa, 1977.
154. *Morita M.* Membrane filtration: A Japanese view, pp. 341—354.— In: *Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
155. *Mulvaney J. G.* Membrane filter techniques in microbiology, pp. 205—253.— In: *Methods in Microbiology*, Vol. 1 (eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons), Academic Press, London, 1969.
156. *NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health).* Asbestos fibers in air, pp. 239-1 through 239-21.— In: *NIOSH manual of analytical methods*, 2nd ed., Nat. Inst. Occup. Safety and Health, Cincinnati, 1977.
157. *NIOSH Manual of Analytical Methods*, 2nd ed., National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, Ohio, 1977.
158. *Nygaard A. P., Hall B. D.* Образование и свойства комплексов РНК—ДНК.— *J. Mol. Biol.*, 9, 125—142 (1964).
159. *Olson W. P.* Утверждение и квалификация фильтрационных систем для удаления бактерий.— *Pharm. Techn.*, 3, 85—92 plus 120 (1979).
160. *Olson W. P.* Система для проверки сохранности дисковых и патронных мембранных фильтров.— *Pharm. Techn.*, Vol. 6, No. 5, 1982.
161. *Olson W. P., Martinez E. D., Kern C. R.* Испытание микропористых фильтр-патронов на диффузию и образование пузырьков: предварительные результаты.— *J. Parent. Sci. Techn.*, 35, 215—222 (1981).
162. *Olson W. P., Vanden Houten L, Ellis J. E.* Проверка работы фильтра стерильного клапана.— *J. Parent. Sci. Techn.*, 35, 70, 71 (1981).
163. *Orofino T. A.* Technology of hollow fiber reverse osmosis systems, pp. 313—341.— In: *Reverse osmosis and synthetic membranes* (ed. S. Sourirajan), Nat. Res. Council of Canada, Ottawa, 1977.
164. *Owen B. B., Afzal M., Cody W. R.* Красящие препараты для фитопланктона и перифитона.— *Brit. Phycolog. J.*, 13, 155—160 (1978).
165. *Pall D. B., Kirnbauer E. A.* Предсказание возможности удаления бактерий с помощью мембранных фильтров, 52nd Colloid and Surface Science Symposium, University of Tennessee, Knoxville, June 12, 1978.
166. *Payment P., Trudel M.* Эффективность нескольких стекловолоконных микрофильтров для выделения полиовирусов из водопроводной воды.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 365—368 (1979).
167. *Pettipher G. L., Mansell R., McKinnon C. H., Cousins C. M.* Экспресс-методика с использованием мембранной фильтрации с последующей эпифлюоресцентной микроскопией для прямого подсчета бактерий в непастеризованном молоке.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 423—429 (1980).
168. *Pickett M., Litsky W.* Эффективный способ проверки антибиотиков на стерильность.— *Pharm. Techn.*, 4, 63—67 (1981).
169. *Pierce H. F.* Нитроцеллюлозные мембраны с нормированной проницаемостью.— *J. Biol. Chem.*, 75, 795—815 (1927).

170. *Presswood W. G.* The membrane filter: its history and characteristics, pp. 1—17.— In: *Membrane Filtration. Applications, Techniques and Problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
171. *Presswood W. G., Brown L. R.* Сравнение мембран Миллипор и Гелман для подсчета ФКП.— *Appl. Microbiol.*, 26, 332—336 (1973).
172. *Presswood W. G., Huyser J., Whitaker C. G.* Методика подсчета частиц пыли в воздухе с помощью мембранной фильтрации.— *Amer. Ind. Hygiene Assoc. J.*, 41, 33—39 (1980).
173. *Rechnitz G. A.* Зонды на основе биоселективных мембранных электродов.— *Sci.*, 214, 287—291 (1981).
174. *Reporter, Minocher.* Синергетические культуры ризобия и корневых клеток *Glycine max*, разделенные с помощью мембранных фильтров.— *Plant Physiol.*, 57, 651—655 (1976).
175. *Resnick I. G., Levin M. A.* Количественная методика подсчета бифидобактерий.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 427—432 (1985).
176. *Reti A. R.* Обсуждение критериев оценки эффективности и целостности стерилизующих фильтров.— *Bull. Parent. Drug Assoc.*, 31, 187—194 (1977).
177. *Reti A. R., Leahy T., Meier P. M.* The retention mechanism of sterilizing and other submicron high efficiency filter structures, pp. 427—431.— In: *Second World Filtration Congress*, London, England, September 18—20, 1979.
178. *Rheinheimer G.* Microbial ecology of a brackish water environment. Springer-Verlag, Berlin, 291 pp., 1977.
179. *Rogers D. E., Cooke G. M., Meyers C. E.* Обнаружение бацилл туберкулеза в образцах промываний рта с помощью выращивания культуры на мембранных фильтрах.— *Amer. Rev. Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 71, 371—381 (1955).
180. *Sato N., Fieldsteel A. H.* Новый метод концентрирования и подсчета бактерий *Mycobacterium leprae*.— *J. Clin. Microbiol.*, 5, 326—328 (1977).
181. *Scheuermann E. A.* Определение бактерий в воздухе с помощью желатиновых мембранных фильтров.— *Pharmazeutisches Industrie* 10/72, 1972.
182. *Schiemann D. A.* Advances in membrane filter application for microbiology, pp. 537—566.— In: *Membrane Filtration: Applications, Techniques and Problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
183. *Schleif R. F., Wensink P. C.* Practical methods in molecular biology, Springer-Verlag, Berlin, New York, 1981.
184. *Schrier B. K., Wilson S. H.* Об измерении трития в ДНК и его использовании для проверки ДНК-полимеразной активности.— *Meth. Cell Biol.*, 13, 105—120 (1976).
185. *Schroeder H. G., Deluca P. P.* Теоретические аспекты стерильной фильтрации и испытаний на целостность фильтрующего материала.— *Pharm. Technol.*, 3, 80—85 (1980).
186. *Membrane and ultrafiltration technology. Recent advances* (ed. J. Scott), Noyes Data Corp., Park Ridge, N. J., 404 pp., 1980.
187. *Hollow fibers. Manufacture and application* (ed. J. Scott), Noyes Data Corp., Park Ridge, N. J., 304 pp., 1981.
188. *Sharpe A. N.* Hydrophobic grid-membrane filters: the (almost) perfect system, pp. 513—535.— In: *Membrane Filtration: Application, Techniques and Problems* (ed. B. J. Dutka), Marcel Dekker, N. Y., 1981.
189. *Sharpe A. N., Michaud G. L.* Гидрофобные мембранные фильтры с нанесенной сеткой: новый подход к подсчету микроорганизмов.— *Appl. Microbiol.*, 28, 223—225, 1974.
190. *Sharpe A. N., Michaud G. L.* Подсчет больших количеств бактерий с использованием гидрофобных мембранных фильтров с нанесенной сеткой.— *Appl. Microbiol.*, 30, 519—524 (1975).

191. Sharpe A. N., Michaud G. L. Enumeration of bacteria using hydrophobic grid-membrane filters, pp. 140—153.— In: Mechanizing Microbiology (eds. A. N. Sharpe, D. S. Clark), Charles C. Thomas Publisher, Springfield, III, 1978.
192. Sharpe A. N., Diotte M. P., Dudas I., Michaud G. L. Автоматизированная пищевая микробиология: потенциал для гидрофобных фильтров с нанесенной сеткой.— Appl. Environ. Microbiol., 36, 76—80 (1978).
193. Sharpe A. N., Peterkin P. I., Dudas I. Мембранная фильтрация пищевых суспензий.— Appl. Environ. Microbiol., 37, 21—35 (1979).
194. Sheldon R. W. Разделение по размерам морского сестона с помощью мембран и стекловолоконных фильтров.— Limnol. Oceanogr., 17, 494—498 (1972).
195. Shepler V. M., Plumer G. J., Faber J. E. Выделение *Vibrio fetus* из бычьей препуциальной жидкости с помощью мембран Миллипор и среды, содержащей антибиотиков.— Amer. J. Veterin. Res., 24, 749—755 (1963).
196. Sherry J. P., Qureshi A. A. Isolation and enumeration of fungi using membrane filtration, pp. 189—218.— In: Membrane filtration: Applications, Techniques and problems (ed. R. J. Dutka), Marcel Dekker, New York, 1981.
197. Sladek K. J., Leahy T. J. Retention of bacteria by membrane filters, pp. 158—161.— In: Proceeding Second World Congress of Chemical Engineering, Vol. IV, Monreal, Canada, October 4—9, 1981.
198. Sladek K. J., Suslavich R. V., Sohn B. I., Dawson F. W. Оптимальные мембранные структуры для роста БГКП и ФКП.— Appl. Microbiol., 30, 685—691 (1975).
199. Sladek K. J., Frith C. F., Cotton R. A. Statistical interpretation of membrane filter bacteria counts, pp. 26—33.— In: Proceeding of the Symposium on the Recovery of Indicator Organism Employing Membrane Filters. U. S. Environmental Protection Agency Document EPA-600/9-77-024, Cincinnati, Ohio, 1977.
200. Snellen J. E., Marr A. G., Starr M. P. Техника мембранной фильтрации для прямого подсчета *Bdellovibrio*.— Current Microbiol., 1, 117—122 (1978).
201. Snyderman R., Goetzl E. J. Молекулярные и клеточные механизмы лейкоцитарного хемотаксиса.— Sci., 213, 830—837 (1981).
202. Sobsey M. D., Jones B. L. Концентрирование полиовируса из водопроводной воды с помощью положительно заряженных микропористых фильтров.— Appl. Environ. Microbiol., 37, 588—595 (1979).
203. Sobsey M. D., Glass J. S. Концентрирование полиовируса из водопроводной воды с помощью электроположительных адсорбентных фильтров.— Appl. Environ. Microbiol., 40, 201—210 (1980).
204. Sorokin Y. I., Kadota H. Techniques for the assessment of microbial production and decomposition in fresh waters, IBP Handbook No. 23, Blackwell, Oxford, 1972.
205. Sourirajan S. Reverse osmosis, Academic Press, New York, 1970.
206. Reverse osmosis and synthetic membranes. (ed S. Sourirajan), Nat. Res. Council Canada, NRCC Publication No. 15627, Ottawa, Canada, 1977.
207. Southern E. M. Обнаружение специфических последовательностей среди фрагментов ДНК, разделенных гель-электрофорезом.— J. Mol. Biol., 98, 503—517 (1975).
208. Compendium of methods for the microbiological examination of foods (ed. M. L. Speck), Amer. Public Health Assoc., Washington, D. C., 1976.
209. Spencer D. W., Manheim F. T. Содержание золы и состав мембран Миллипор НА.— U. S. Geol. Survey Res. 1969, pp. D288—D290, 1969.
210. Spurny K. R., Lodge J. P., Frank E. R., Sheesley D. C. Фильтрация

- аэрозолей с помощью мембран Нуклепор. Структурные и фильтрационные свойства.— *Environ. Sci. Technol.*, 3, 453—464 (1969).
211. *Spurny K. R., Lodge J. P., Frank E. R., Sheesley D. C.* Фильтрация аэрозолей с помощью мембран Нуклепор. Отбор проб и замер аэрозолей.— *Environ. Sci. Technol.*, 3, 464—468. (1969).
 212. *Strickland J. D. H., Parsons T. R.* Практическое руководство по анализу морской воды, Bulletin 267, Fisheries Research Board of Canada, 310 pp., 1972.
 213. *Swoager W. C., Lindstrom F. S.* Выделение и подсчет бактерий *Athiorhodaceae* с помощью мембранных фильтров.— *Appl. Microbiol.*, 22, 683—687 (1971).
 214. *Talal N., Pillarisetty R.* Radioimmunoassay for antibodies to deoxyribonucleic acid, pp. 652—655.— In: *Manual of Clinical Immunology* (eds. N. R. Rose, H. Friedman), American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1976.
 215. *Tanny G. B., Hauk D.* Фильтрация частиц и эмульсий с помощью гофрированного узкоканального модуля с поперечным потоком.— *Separation Sci. Technol.*, 15, 317—337 (1980).
 216. *Tanny G. B., Hauk D., Merin U.* Biotechnological applications of cross-flow microfiltration. *Desalination*, Vol. 41, Elsevier, Amsterdam, 1982.
 217. *Tanny G. B., Mirelman D., Pistole T.* Усовершенствованная техника фильтрации для концентрирования и культивирования бактерий.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 269—273 (1980).
 218. *Theeuwes F.* Система подачи лекарств.— *Pharm. Therapy*, 13, 149—191 (1981).
 219. *Thomas D. G.* Dynamic membranes — their technological and engineering aspects, pp. 295—312.— In: *Reverse Osmosis and Synthetic Membranes* (ed. S. Sourirajan), National Research Council of Canada Publication No. 15627, Ottawa, Canada, 1977.
 220. *Thomas H. A., Woodward R. L.* Оценка плотности колиформ методами мембранных фильтров и ферментации в пробирках.— *Amer. J. Public Health*, 45, 1431—1437 (1955).
 221. *Thomson R. O., Foster W. H.* Harvesting and clarification of cultures—storage of harvest, pp. 379—385.— In: *Methods in Microbiology*, Vol. 2 (eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons), Academic Press, London, 1970.
 222. *Tobin R. S., Dutka B. J.* Сравнение поверхностной структуры, связывания металлов и выделения ФКП на девяти мембранных фильтрах.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 34, 69—79 (1977).
 223. *Tobin R. S., Lomax P., Kushner D. J.* Сравнение методов «наиболее вероятного числа» и мембранной фильтрации на девяти мембранах для подсчета БГКП в питьевой воде, загрязненной сточными водами.— *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 186—191 (1980).
 224. *Todd R. L., Kerr T. J.* Сканирующая электронная микроскопия микробных клеток на мембранных фильтрах.— *Appl. Microbiol.*, 23, 1160—1162 (1972).
 225. *Tsuneishi N., Goetz A.* Метод быстрого культивирования *Desulfovibrio aestuarii* на мембранах.— *Appl. Microbiol.*, 6, 42—44 (1958).
 226. *U. S. Federal Government. Regulations* (Interim Federal Specification NNN-D-00370), 13 April 1965.
 227. *U. S. Federal Government. Regulations* (Military Standards MIL-STD-105); Military Specification MIL-D-37005A, Disk, Filtering, Microporous, 29 Sept., 1976.
 228. *United States Pharmacopeia, 20th edition.* Sterility Tests, pp. 881, 882.— In: *United States Pharmacopeia*, 12601 Twinbrook Parkway, Rockville, MD 20852, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1979.
 229. *Van Eck W. H.* Пригодность техники мембранной фильтрации для изу-

- чения ультраструктуры *Fusarium solani* в почве.— Can. J. Microbiol., 22, 1628—1633 (1976).
230. Vasconcelos G. J., Swartz R. G. Выживаемость бактерий в морской воде при использовании аппарата с диффузионной ячейкой in situ.— Appl. Environ. Microbiol., 31, 913—920 (1976).
231. Veldkamp H. Enrichment cultures of prokaryotic organisms, pp. 348—351.— In: Methods in Microbiology, Vol. 3A (eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons), Academic Press, London, 1970.
232. Wallhausser K. H. Является ли в действительности удаление микроорганизмов фильтрацией методом стерилизации? — J. Parenter. Drug Assoc., 33, 156—170 (1979).
233. Ward P. A. Chemotaxis, pp. 107—109.— In: Manual of Clinical Immunology (eds. N. R. Rose, H. Friedman), Amer. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 1976.
234. Wayne L. G. Использование фильтров Миллипор в клинических лабораториях.— Amer. J. Clin. Pathol., 28, 565—567 (1957).
235. Wetzel R. G., Likens G. E. Limnological Methods, W. B. Saunders, Philadelphia, 357 pp., 1979.
236. Wilsnack R. E., Meyer F. J., Smith J. G. Испытания медицинского оборудования на токсичность по отношению к культуре клеток человека и корреляции полученных результатов с тестами на животных.— Bio-materials, Medical Devices and Artificial Organs, 1, 543—562 (1973).
237. Winn W. R., White M. L., Cater W. T., Miller A. B., Finegold S. M. Быстрый диагноз бактеремии с помощью количественной дифференциальной культуры, полученной мембранной фильтрацией.— J. Amer. Med. Assoc., 197, 539—548 (1966).
238. World Health Organization. International standards for drinking water, 2nd ed., World Health Organization, Geneva, 1972.
239. Wright G. L., Mallmann W. L. Способ окрашивания кислотоустойчивых бацилл на мембранных фильтрах.— Amer. Rev. Respir. Diseases, 87, 432—434 (1963).
240. Wyrick P. B., Gooder H. Рост стрептококковых протопластов и L-колоний на мембранных фильтрах.— J. Bacteriol., 105, 646—656 (1971).
241. Young M. A modified spread plate technique for the determinations of concentrations of viable heterotrophic bacteria, pp. 40—51.— In: Methodology for Biomass Determinations and Microbial Activities in Sediments, ASTM STP 673 (eds. C. D. Litchfield, P. L. Seyfried), Amer. Soc. Testing and Materials, Philadelphia, PA, 1979.
242. Zierdt C. H. Прилипание бактерий, дрожжевых и кровяных клеток, а также латексных шариков к крупнопористым мембранным фильтрам.— Appl. Environ. Microbiol., 38, 1166—1172 (1979).
243. Zimmermann R. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning microscopy, pp. 103—120.— In: Microbial ecology of a brackish water environment (ed. G. Rheinheimer), Springer-Verlag, Berlin, 1977.
244. Zimmermann R., Meyer-Reil L. Новый метод флюоресцентного окрашивания популяций бактерий на мембранных фильтрах.— Kiel. Meeresforsch., 30, 24—27 (1974).
245. Zimmermann R., Iturriaga R., Becker-Birck J. Одновременное определение общего числа водных бактерий и тех из них, что участвуют в процессе дыхания.— Appl. Environ. Microbiol., 36, 926—935 (1978).

Предметный указатель

Аппараты

диализные 126
для внутривенных вливаний 195, 196
для макрофильтрации 117—127
для стерилизующей фильтрации 174, 185—188, 191
для фильтрации воздуха 127, 391—396
замкнутые 393
ограничительный жиклер 394, 395
открытые 393
с ламинарным потоком 127
с удалением аэрозолей 127
дозаторы лекарств 364
имитатор клеточного всасывания 364, 365
кассетные системы 306, 308, 362
микрофильтрационные 127
на дисковых мембранах 143
для вакуумной фильтрации 143
для фильтрации под давлением 144
с параллельной установкой мембран 144
с последовательной установкой мембран 144
на полых волокнах 118, 119, 125, 126, 360
обратноосмотические 123, 124, 371—374
на полых волокнах 372, 374
плоскокамерные 371
рулонного типа 372
составные 373
оксигенаторы 364
патронного типа. См. Фильтр-патроны
принципы выбора 128, 129
проверка целостности 117, 181
режимы фильтрации

тангенциальный 306—309
тупиковый 306
с плоскими элементами 121, 190
с рулонными элементами 119, 188—191
стерилизация 184, 188, 240, 241
с трубчатыми элементами 189
тонкоканальные 361
ультрафильтрационные 124, 126, 127, 359—366
«фильтр обратного потока» 309
шприц-насадки 148, 191, 193
проверка целостности 193
ячейки
для культивирования клеток 118, 293, 298—302
с перемешиванием 118, 123, 313, 359
хемотаксисные 118, 119, 123, 298—302

Бактерии-индикаторы 269, 273, 334
БГКП 111, 116, 251, 269, 270—280, 286, 292, 334, 335
определение 274, 275
тест 276—279
в определении качества мембран 110—112, 281—285
тест-бактерии. См. Тест-бактерии
ФКП 32, 110—112, 125, 239, 258, 273—275, 286, 292
тест 279—281
отличие от теста на БГКП 274
ФС 285
Бернулли закон 386

Вирусы

агент *Норуолка* 334
аденовирусы 334
бактериофаги 345, 346

- вирусологический стандарт 342
гепатита А 334
гриппа 346
инактивация 341, 344
Коксаки 334
концентрирование. *См.* Концентрирование вирусов, методы прямого определения 335
полиовирусы 334
полиомиелита 338—340, 345—347
реовирусы 334
ротавирусы 334
стабилизация 342
степень удаления (извлечения) 342
ультрафильтрация 335
эховирусы 334
- Дарси закон** 352
Диализ 21, 126, 129, 348, 354
 коэффициент 354
 равновесный 355
Диафильтрация 361—363
 альбумина 366
 схема 362
Диффузия 348, 350
Доннана потенциал 353
— эффект 353, 356
- Забивание пор мембран** 88—92, 185
 в фильтр-патронах 132
 коэффициент 328
 предотвращение 178, 262
 при фильтрации воздуха 389, 390
 скорость 89
 влияние перепада давления 90
 — пористости 91
 — степени анизотропии 91
 метод определения 89—91
 эритроцитами 89
- Концентрационная поляризация** 352—354, 363
 условия снижения 353
Концентрирование (извлечение)
 бактерий 305—313
 бактериофагов 345—346
 вирусов 118, 121, 127, 184, 189, 333—346
 из больших объемов 340—343, 347
 микроорганизмов 66, 189, 288—290, 305—313
 эндотоксинов 184
- Макрофильтрация** 117, 130
 инъекционных растворов 115
Мембранный зонд 330
Мембраны
 абсолютные 40
 адгезия клеток 302
 адсорбция
 бактерий 289, 336, 343
 бактериофагов 345
 белков 325, 326, 332
 вирусов 333
 клеток 304, 305
 компонентов питательных сред 247—249
 нуклеиновых кислот 320
 радиоактивных изотопов 314—316
 акриловые 156
 анизотропные 31, 86
 ацетилцеллюлозные 18, 49, 155
 биodeградация 374
 в анализе
 аминокислот 330
 белков 325, 326, 332
 вирусов 333
 газопроницаемые 330
 десорбция
 бактерий 289
 вирусов 335, 340, 341, 344, 347
 динамические 28
 для лабораторных анализов 157—162
 желатиновые 253, 401, 402, 440
 жидкие 28
 загрязнение 374
 заряд поверхности 32, 37
 из альгината алюминия 65, 66, 340
 изотропные 86
 из полого волокна 63, 64, 360, 361
 из регенерированной целлюлозы 67, 155
 методы получения 46—56
 механизм селективности 33—39
 микрофильтрационные 26, 130—132
 традиционные (сетчатые) 130—132
 трековые 29, 30, 59—61, 131
 модифицированные 18, 66, 67
 окрашенные 18, 66, 208, 212, 240, 327
 с гидрофобным краем 18, 66, 153, 201, 240, 267
 с нанесенной сеткой 66, 153, 211, 239, 240, 253—256, 262
 с положительно заряженной по-

верхностью 118, 289, 337, 343
 нитроцеллюлозные 18, 48, 57, 58, 154
 обратноосмотические 369—371
 определение целостности
 метод точки пузырька 170—173
 отличия от глубинных фильтров 28, 41—43
 перевод в прозрачное состояние 206, 220, 221
 полиамидные 156
 поливинилиденфторидные 156, 422, 432
 поливинилхлоридные 155
 преимущества 17, 18
 принципы отбора для очистки лекарств 180
 растворимость 40, 41, 72, 92—94, 122, 123, 207, 233, 318
 регенерация 154, 185, 375
 сертификаты 178
 с извилистыми порами 124
 с капиллярными порами 124
 содержание примесей 107, 108
 составные 61, 62, 65
 срок хранения 265
 степень анизотропности (СА) 86, 87, 120, 125, 238
 стерилизация. См. Стерилизация мембран
 структура 29, 30
 технические условия 112, 115
 технические характеристики 413, 440
 тефлоновые 18, 52, 53, 62, 63, 81, 94, 105, 134, 156, 158—161, 186, 196, 317, 419, 438
 ультрафильтрационные 26, 356—359
 анизотропные 357
 изотропные 357
 погружаемые 363
 трековые 436, 437
 физические и механические характеристики 85—88, 112—115
 краевой угол смачивания 31, 73, 78
 модуль упругости 86
 показатель преломления 112, 115, 206
 термическая устойчивость 152
 усилие на разрыв 153
 флюоресценция 214
 хрупкость 264
 фитильное испытание 86
 химическая устойчивость. См. Мембраны, растворимость

Мембранная фильтрация
 области применения 13, 17—20
 ограничения метода 39—41
 определение 17
 преимущества 17, 18
 Микрофильтрация 21, 130, 350
 отличие от ультрафильтрации 350

Нуклеиновые кислоты
 авторадиография 325
 адсорбция 319, 320
 гибридизация 13, 320—325, 331
 метод переноса пятен (blotting) 320—325
 «западный» 325
 «северный» 322
 «южный» 321
 радиоактивный зонд 323
 рекомбинантные 13, 325, 331
 Номинальная отсекаемая молекулярная масса (НОММ) 346, 357—359, 362, 363, 367, 370, 377, 435

Обратный осмос 21, 119, 122, 123, 129, 130, 366—369, 377
 обессоливание воды 375, 378
 обработка стоков 376

Подсчет частиц
 бактерий 113, 116, 205, 234
 в воде 269—373
 в воздухе 400—402, 404
 влияние «эффекта колыбели» 238
 жизнеспособных 237—247
 особых групп 250—253
 под микроскопом 209—219, 234
 235
 сравнение с методом НВЧ 238, 254, 270—273
 сравнение с чашечными методами 248—250
 допустимый уровень качества (ДУК) 114
 водорослей 235
 инертных 205, 223—228
 асбестовых волокон 228—231
 в воде 327
 в горючем 327
 в фармакологии 226—227
 эффективность подсчета 225
 пробоотборники для анализа воды 259—262
 жидких проб 257
 поверхности 259

- раковых клеток 205, 231—234
фитопланктона 219—223
Пористые перегородки
классификация 24—29
селективность 44, 45
структура 25, 44
Портона сетка 225, 226
Поры
объем (пористость) 31, 79, 112, 115, 131, 295
плотность 231
размер 31, 40, 68—85
абсолютный 69
методы оценки 69—85, 70—74, 76, 82
номинальный 40, 69, 91, 115, 305
среднепоточный 77
эффективный 305
распределение по размерам 76, 77
дифференциальное 80
интегральное 80
методы оценки 77—81, 95—102, 116, 181
Процессы фильтрации 22

Скорость фильтрации
влияние анизотропии мембран 151
определяющие факторы 30—39
Смачивающие вещества и примеси 102—108, 124, 178
анализ методами ВЭЖХ 106, 119
гидроксипропилцеллюлоза 102
глицерин 102—104, 132
детергенты
Клюссель-Ж 102
Твин-80, 102 104, 262
Тритон Х-100 102, 104, 252
содержание в мембранах 106, 108, 109
после стерилизации 106
токсичность 108—110, 178
Стерилизация мембран 18, 165—169
автоклавированием 106, 114, 166, 188, 218, 241, 265
оксидом этилена 167, 265
проверка 188
продувка паром 184
радиационная 168
сухим жаром 167
химическая 167
Стерилизующая фильтрация
вакцин 161
в анализе на стерильность
антибиотиков 200—203
система Стеритест 202
стандартный метод 200
воды 175—177
воздуха. См. Фильтрация воздуха
механизм 179
напитков 196—200
растворов 163—165, 172—175
инъекционных 13, 177—188, 196, 334
культуральных сред 172
сыворотки крови 13

Тест-бактерии
в оценке мембран 164—165
логарифмический показатель снижения (ЛПС) 164
сравнение с методом точки пузырька 164
обнаруженные в воде 101
Bacillus subtilis 115, 406
Enterobacter aerogenes 105
Escherichia coli 113, 248, 249, 289
Limulus 109
Micrococcus flavus 330
Mycoplasma laidlawii 101
Pseudomonas diminuta 34, 35, 95, 97—99, 101, 105
Serratia marcescens 95, 99, 113, 115

Ультрафильтрация 21, 130, 349, 373, 377—378
вирусов 335—347
в кристаллографии 366
в очистке
воды 335
стоков 366
в пищевой промышленности 121, 366
в фармакологии 18, 366
промышленная 365, 366

Фика закон 81, 350
Фильтрация
влияние побочного потока 37
классификация процессов 22
коалесцирующая 119, 405
определение 17, 21
Фильтрация воздуха
влияние гравитации 388
механизмы 386—388
диффузия 387
прямой перехват 386
соударение 387
электростатическое притяжение 387
эффект рикошетирувания 388

- отбор проб 391—396
 - изокинетический 392, 395, 402
 - неизокинетический 394
 - расположение пробоотборника 394
 - трубка *Пито* 395
- отличие от фильтрации жидкостей 37, 38
- очистка газов 13, 14, 404, 405
- стерилизующая 14, 121, 191, 379, 405—411
- эффективность 389—391, 399
- Фильтр-патроны 13, 67, 132—139, 406, 407
 - волоконные 361
 - для стерилизации лекарств 183
 - для фильтрации газов. *См. также*
- Фильтрация воздуха
 - забивание пор мембран и фильтров 132
 - задержка тест-бактерий 101
 - капсульные 136, 190, 309
 - на полых волокнах 125
 - определение целостности 171
 - расчет 139, 410, 411
 - с тангенциальным потоком 307, 310, 311
 - стерилизация 168
- Фильтры
 - адсорбция вирусов 35, 336, 342—346
 - глубинные 19, 24, 25, 28, 35
 - для очистки воздуха 396—399, 404, 405
 - Зейтца* 35
 - из асбеста 35, 36
 - из спекаемых частиц 66
 - бронзовые 405
 - серебряные 66, 126, 399
 - стеклянные 27, 66
 - фарфоровые 27, 66
- поверхностный заряд 35, 388
- пророст 42
- сеточные 24
- Фракционирование по размерам клеток 304—305
- Хагена — Пуазейля* формула 81
- Частицы
 - в воде 23, 205, 221, 223—228, 269, 327
 - отбор проб 257, 259—262
 - размеры 224
 - распределение по размерам 223—226, 380
 - в воздухе 23, 384. *См. также*
- Фильтрация воздуха
 - агломераты 382
 - вредные 385
 - гравиметрия 396—398
 - кристаллиты 382
 - первичные 380
 - пыль 381
 - разделение по размерам 131
 - распределение по размерам 223—226, 380, 382
 - скорость лобовая 386, 389
 - по́ровая 386
 - средний диаметр 383
 - стандарты 389
 - характеристики 381
 - хлопья 382
- классификация 22, 23
- латексные 343, 399
- номинальный размер 24
- Экстрагируемые вещества. *См. также*
- Смачивающие вещества и примеси
 - методы анализа 103, 105
 - удаление из мембран 182

Оглавление

Предисловие редактора перевода	5
Предисловие академика Г. Н. Флерова	6
Предисловие	13
Глава 1. ВВЕДЕНИЕ	17
Глава 2. СТРУКТУРА И ДЕЙСТВИЕ МЕМБРАН	21
2.1. Введение	21
2.2. Размеры частиц	22
2.3. Типы пористых перегородок	24
2.4. Структура мембран	29
2.5. Количественные характеристики мембран	30
2.6. Как работает мембрана	33
2.7. Некоторые неожиданные ограничения метода мембранной фильтрации	39
2.8. Сравнение глубинных и мембранных фильтров	41
2.9. Заключение	43
Глава 3. ПРОИЗВОДСТВО МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ	46
3.1. Введение	46
3.2. Материалы для изготовления целлюлозных мембран	48
3.3. Принципы метода отливки мембран	49
3.4. Лабораторный метод отливки мембран	55
3.5. Структура нитроцеллюлозных мембран	57
3.6. Трековые мембраны	59
3.7. Составные мембраны	61
3.8. Некоторые другие подходы к созданию мембран	62
3.9. Модифицированные мембранные фильтры	66
3.10. Заключение	67
Глава 4. ХАРАКТЕРИСТИКИ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ	68
4.1. Введение	68
4.2. Определение размеров пор мембран	68
4.3. Физические и механические характеристики	85
4.4. Забивание пор и скорость фильтрации	88
4.5. Химическая совместимость мембранных фильтров с фильт- руемой средой	92
4.6. Методы задержки бактерий	95
4.7. Содержание экстрагируемых веществ и золы в мембранах	102
4.8. Токсичность примесей, содержащихся в мембранах	108

4.9. Испытания мембран, применяемых для биологических целей	110
4.10. Государственные стандарты США на мембранные фильтры	112
4.11. Заключение	115
Глава 5. ПРОИЗВОДИТЕЛИ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ	117
Глава 6. ВЫБОР И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ УСТАНОВОК	128
6.1. Введение	128
6.2. Вопросы, возникающие при выборе мембранной установки	128
6.3. Размер частиц фильтруемой среды	129
6.4. Мембраны и фильтры для микрофильтрации	130
6.5. Мембранные модули патронного типа	132
6.6. Расчет необходимой площади поверхности мембран	139
6.7. Устройство фильтровальных установок с дисковыми мембранами	143
6.8. Некоторые специальные вопросы применения дисковых мембран	150
6.9. Повторное использование мембранных фильтров	154
6.10. Материалы, используемые для мембранных фильтров	154
6.11. Заключение	157
Глава 7. СТЕРИЛИЗАЦИЯ И ПРОЦЕСС МЕМБРАННОЙ ФИЛЬТРАЦИИ	163
7.1. Введение	163
7.2. Стерилизация мембранных фильтров	165
7.3. Стерилизация фильтр-патронов	168
7.4. Определение целостности мембраны методом точки пузырька	169
7.5. Фильтрация сыворотки крови и питательных сред для культуры тканей	172
7.6. Получение стерильной воды	175
7.7. Мембранная фильтрация при производстве лекарственных препаратов	177
7.8. Фирмы, изготавливающие крупномасштабные фильтрационные установки	188
7.9. Шприц-насадки для стерилизации небольших объемов жидкостей	191
7.10. Стерилизующая фильтрация в пивоварении	196
7.11. Осветление и стабилизация вин	198
7.12. Проверка на стерильность при помощи мембранных фильтров	200
7.13. Заключение	203
Глава 8. МЕМБРАННЫЕ ФИЛЬТРЫ, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ДЛЯ АНАЛИЗА ПРЯМУЮ СПЕКТРОСКОПИЮ	205
8.1. Введение	205
8.2. Перевод мембран в прозрачное состояние	206
8.3. Черные и цветные мембраны в микроскопических исследованиях	208
8.4. Подсчет бактерий под микроскопом в проходящем свете	209
8.5. Подсчет бактерий с помощью эпифлюоресцентной микроскопии	212
8.6. Микроскопический подсчет фитопланктона в проходящем свете	219

8.7. Подсчет фитопланктона с помощью эпифлюоресцентной микроскопии	221
8.8. Замер и подсчет инертных частиц	223
8.9. Подсчет асбестовых волокон	228
8.10. Подсчет раковых клеток (эксфолиативная цитология) . . .	231
8.11. «Окрашивание» с помощью флюоресцирующих антител . .	234
8.12. Сканирующая электронная микроскопия	234
8.13. Заключение	235
Глава 9. ПОДСЧЕТ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	237
9.1. Введение	237
9.2. Специальные мембраны для подсчета жизнеспособных микроорганизмов	238
9.3. Метод подсчета жизнеспособных микроорганизмов	240
9.4. Питательная среда для подсчета жизнеспособных микроорганизмов	247
9.5. Сравнение метода мембранных фильтров с чашечным методом	248
9.6. Подсчет некоторых особых групп микроорганизмов	250
9.7. Мембранные фильтры с гидрофобной сеткой	253
9.8. Специальные устройства для полевых работ	256
9.9. Микробиология пищевых продуктов и напитков	262
9.10. Трудности при подсчете жизнеспособных микроорганизмов . .	264
9.11. Оценка активности антимикробных агентов	266
9.12. Заключение	267
Глава 10. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ПРОВЕРКА ВОДЫ	269
10.1. Введение	269
10.2. Значение мембранной фильтрации	270
10.3. Сравнение испытаний на БГКП и ФКП	273
10.4. Детальное описание теста на БГКП	276
10.5. Детальное описание теста на ФКП	279
10.6. Мембранные фильтры, используемые в тесте на ФКП . . .	281
10.7. Фекальные стрептококки	285
10.8. <i>Salmonella</i> и <i>Shigella</i>	287
10.9. Другие бактерии	290
10.10. Заключение	292
Глава 11. ПРИМЕНЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ФИЛЬТРОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ И АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ	293
11.1. Введение	293
11.2. Ячейки для культивирования	293
11.3. Хемотаксис и миграция лейкоцитов	298
11.4. Синхронизация роста клеток	302
11.5. Фракционирование клеток по размерам	304
11.6. Сбор и концентрирование микроорганизмов	305
11.7. Радиоизотопы и мембранные фильтры	313
11.8. Изучение нуклеиновых кислот	319
11.9. Электрофорез белков	325
11.10. Фильтрация водных проб для химического анализа . . .	326
11.11. Устройства для введения лекарств с помощью мембран . .	328
11.12. Электродные зонды, содержащие мембраны	329
11.13. Заключение	331
Глава 12. АНАЛИЗ ВИРУСОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В ВОДЕ	333
12.1. Введение	333

12.2. Типы вирусов, находящихся в воде	334
12.3. Методы концентрирования вирусов	335
12.4. Выделение вирусов с использованием процессов адсорбции и десорбции на мембранах и фильтрах	336
12.5. Специальная методика выделения вирусов из питьевой воды	340
12.6. Применение положительно заряженных фильтров для вы- деления вирусов	343
12.7. Концентрирование вирусов с помощью ультрафильтраци- онных мембран	346
12.8. Заключение	347
Глава 13. УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ И ОБРАТНЫЙ ОСМОС	348
13.1. Введение	348
13.2. Процессы молекулярного разделения	350
13.3. Диализ	354
13.4. Ультрафильтрация	356
13.5. Мембраны для ультрафильтрации	356
13.6. Оборудование для ультрафильтрации	359
13.7. Использование ультрафильтрации и диализа в медицине	363
13.8. Крупномасштабное применение ультрафильтрации в про- мышленности	365
13.9. Обратный осмос	366
13.10. Мембраны для обратного осмоса	369
13.11. Конструктивные особенности установок для обратного ос- моса	371
13.12. Загрязнение и биодеградация мембран	374
13.13. Промышленные процессы с использованием обратного ос- моса	375
13.14. Заключение	377
Глава 14. ФИЛЬТРАЦИЯ ВОЗДУХА	379
14.1. Введение	379
14.2. Частицы в воздухе	380
14.3. Механизмы фильтрации воздуха	386
14.4. Оборудование для отбора проб воздуха	391
14.5. Фильтрующие материалы, используемые при фильтрации воздуха	396
14.6. Проверка эффективности мембран, предназначенных для фильтрации воздуха	399
14.7. Определение содержания микроорганизмов в воздухе .	400
14.8. Анализ инертных частиц с помощью мембран и фильтров	402
14.9. Очистка газов фильтрацией	404
14.10. Получение стерильного воздуха	405
14.11. Заключение	412
Приложение. ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАН, ВЫПУ- СКАЕМЫХ РАЗНЫМИ ФИРМАМИ-ИЗГОТОВИТЕЛЯМИ	413
Литература	441
Предметный указатель	454

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., д. 2, изд-во «Мир».

Монография

Томас Д. Брок

МЕМБРАННАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ

Научн. редактор А. Н. Куксенко
Мл. научн. редакторы Р. Х. Зацепина, Г. Г. Сорокина,
В. Н. Цлаф
Художник А. В. Савельев
Художественный редактор К. В. Радченко
Технические редакторы А. Г. Резоухова, З. И. Резник
Корректор Л. Д. Панова

ИБ № 5799

Сдано в набор 6.05.86. Подписано к печати 26.12.86. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 1. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 14,5 бум. л. Усл. печ. л. 29. Усл. кр.-отт. 29. Уч.-изд. л. 29,95. Изд. № 2/4530. Тираж 4000 экз. Зак. № 1481. Цена 4 р. 80 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР», 129820, ГСП, Москва,
И-110, 1-й Рижский пер., 2

Ленинградская типография № 4 ордена Трудового Красного Знамени Ленинградского объединения «Техническая книга» им. Евгении Соколовой Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 191126, Ленинград, Социалистическая ул., 14.